



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***CANDIDA GLABRATA* UM PATOGÉNIO EMERGENTE?**

Trabalho submetido por
Filipa Alexandra Veiga Matilde
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2014



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***CANDIDA GLABRATA* UM PATOGÉNIO EMERGENTE?**

Trabalho submetido por
Filipa Alexandra Veiga Matilde
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Mestre Teresa Maria Silva do Nascimento

Outubro de 2014

Agradecimentos¹

Terminar esta etapa tem-se provado um verdadeiro desafio, e nem seria uma grande vitória se assim não fosse.

Não teria sido possível fazer esta jornada que culmina neste trabalho sem a ajuda e compreensão de algumas pessoas. Desde todos os colegas que me desafiaram e acompanharam neste percurso até aos professores que nos transmitiram tanto.

A família é sem dúvida quem aqui nos trouxe e quem vai estar à espera para festejar no fim. Agradeço por isso aos meus pais, Fernanda e Orlando, pela motivação e força que me deram ao longo destes anos e acima de tudo agradeço por tornarem possível a minha formação nesta área, obrigada por estarem a meu lado.

Agradeço ao João por todo o apoio e compreensão principalmente durante a elaboração desta monografia, obrigada por me mostrares que era possível.

A todas as pessoas que fizeram parte da minha vida académica nestes últimos anos, tenho a certeza que vão deixar saudades.

Quero agradecer à professora Teresa Nascimento pela paciência e disponibilidade demonstrada. Obrigada por me guiar e orientar neste trabalho e despertar o meu interesse nesta área.

¹ Nota: o texto segue ortografia antiga

Resumo

Nas últimas décadas as infecções fúngicas têm aumentado exponencialmente. Apesar de *Candida albicans* (*C. albicans*) continuar a ser a espécie isolada com maior frequência, as espécies não albicans tem vindo a proliferar rapidamente. *Candida glabrata* (*C. glabrata*) é uma das espécies emergentes como patógeno oportunista humano, sendo responsável maioritariamente por candidoses invasivas em pacientes imunocomprometidos. A percentagem de resistência aos antifúngicos nesta espécie é superior às outras do género *Candida*, por isso torna-se imperativo um melhor conhecimento dos seus mecanismos de virulência. Com a evolução das técnicas disponíveis para análise, os estudos efectuados revelam dados mais pormenorizados que demonstram as grandes diferenças entre *C. glabrata* e *C. albicans*, e as inúmeras características que *C. glabrata* partilha com *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Nesta revisão faço um balanço dos dados recolhidos até à data, na esperança de ser possível uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência de *C. glabrata*, assim como outra informação que permita um melhor controlo e tratamento de infecções por esta espécie.

Palavras-chave: *Candida glabrata*, Espécies não albicans; Candidose invasiva; Resistência a antifúngicos.

Abstract

In the last pass years fungal infections have increased exponentially. Although *Candida albicans* remain the most isolated species, NCAC (non-albicans) species have been rapidly proliferating. *Candida glabrata* (*C. glabrata*) is an emerging opportunistic human pathogenic and it's mainly responsible for invasive candidiasis in immunocompromised patients. The percentage of resistance to antifungal agents in this specie is superior to the others *Candida* species so a better understanding of its mechanisms of virulence becomes

imperative. With the evolution of the techniques available for analysis, studies reveal more detailed data that demonstrate the wide differences between *C. glabrata* and *C. albicans*. It is now known that *C. glabrata* shares numerous features with *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). In this review I intend to summarise the data collected to date, hoping to be able to better understand the mechanisms of resistance of *C. glabrata* as well as other information that allows a better control and treatment of infections caused by this species.

Key-words: *Candida glabrata*, NCAC; Invasive candidiasis; Drug resistance.

Índice Geral

| | |
|---|----|
| Introdução | 17 |
| Biologia do género <i>Candida</i> | 19 |
| Epidemiologia e factores de risco | 22 |
| Patogenicidade e factores de virulência | 30 |
| Diagnóstico de infecção por <i>C. glabrata</i> | 38 |
| Diagnóstico clínico | 38 |
| Métodos de identificação laboratorial | 40 |
| Métodos de diagnóstico convencional | 40 |
| Métodos de diagnóstico Imunobioquímico e Molecular | 44 |
| Tratamento | 51 |
| Tipos de tratamento | 52 |
| Mecanismos de acção/grupos de antifúngicos | 55 |
| Escolha do antifúngico | 58 |
| Resistência aos antifúngicos | 63 |
| Perspectivas futuras | 68 |
| Conclusão | 70 |
| Bibliografia | 73 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Imagem microscópica <i>C. glabrata</i> ampliação 400x..... | 19 |
| Figura 2: Imagem microscópica <i>C. albicans</i> ampliação 400x..... | 19 |
| Figura 3: Imagem microscópica <i>C. krusei</i> ampliação 400x..... | 19 |
| Figura 4: Meio cromogénico com colónias de diferentes espécies de <i>Candida</i> | 20 |
| Figura 5: Dados de estudos de base populacional com a proporção das espécies mais relevantes de <i>Candida</i> causadoras de candidose..... | 26 |
| Figura 6: A. Variação geográfica de <i>C. glabrata</i> isolada de candidoses invasivas. B. Distribuição das principais espécies de <i>Candida</i> de acordo com a faixa etária do paciente..... | 27 |
| Figura 7: Placa com meio cromogénico para <i>Candida</i> spp.. A. Colónias de coloração turquesa de <i>C. glabrata</i> ; B. colónias de coloração turquesa com centro escuro correspondentes a <i>C. krusei</i> | 40 |
| Figura 8: Tratamento AF proposto para pacientes em estado crítico com candidose invasiva..... | 52 |
| Figura 9: Abordagem para a escolha do tratamento para doentes não neutropénicos adultos em estado crítico com provável infecção por <i>Candida</i> spp..... | 54 |
| Figura 10: Mecanismos de resistência de <i>C. glabrata</i> aos principais grupos de AF..... | 63 |

Índice de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Estudos epidemiológicos seleccionados de 2000 a 2010, com dados sobre a distribuição de espécies de <i>Candida</i> em vários tipos de candidoses..... | 22 |
| Tabela 2: Epidemiologia da infecção por <i>C. glabrata</i> | 24 |
| Tabela 3: Genes de <i>C. glabrata</i> implicados na sua patogenicidade e virulência..... | 32 |
| Tabela 4: Características de um teste ideal para diagnóstico de candidose invasiva..... | 38 |
| Tabela 5: Resumo de recomendações do painel EFISG/ESCMID e nível de evidência para os testes de diagnóstico utilizados em candidoses..... | 43 |
| Tabela 6: Potenciais vantagens e desvantagens de métodos de cultura não baseados em culturas..... | 44 |
| Tabela 7: Desempenho dos testes comerciais de detecção de Ag e Ac, disponíveis para diagnóstico de IC..... | 45 |
| Tabela 8: Metodologias microbiológicas utilizadas no diagnóstico de IC em UCIs e as suas vantagens e desvantagens..... | 49 |
| Tabela 9: Principais grupos de AF utilizados no tratamento de infecções fúngicas..... | 55 |
| Tabela 10: Antifúngicos utilizados no tratamento de candidoses..... | 57 |
| Tabela 11: Directrizes da ISDA para o tratamento de candidose em pacientes adultos não neutropénicos..... | 58 |
| Tabela 12: Terapêutica farmacológica contra infecções fúngicas causadas por <i>Candida</i> em pacientes imunocomprometidos..... | 59 |
| Tabela 13: Sensibilidade de <i>Candida</i> spp. aos diferentes antifúngicos..... | 65 |

Lista de abreviaturas

| | |
|------|---|
| UCI | Unidade de cuidados intensivos |
| DAS | Sabouraud Dextrose Agar |
| CMI | Concentração mínima inibitória |
| CI | Candidose invasiva |
| AF | Antifúngico |
| MDR | <i>Multi-drug resistance</i> |
| ATB | Antibióticos |
| VIH | Vírus da imunodeficiência humana |
| SIDA | Síndrome da Imunodeficiência adquirida |
| CVC | Cateter venoso central |
| ISDA | <i>Infectious Diseases Society of America</i> |
| IFI | Infecções fúngicas invasivas |
| AmB | Anfotericina B |
| BDG | β -1,3-D-glicano |

Introdução

Ao longo dos últimos anos as infecções fúngicas aumentaram significativamente, e aumentou também a lista de diferentes fungos responsáveis por estas, sendo as espécies do género *Candida* sem dúvida aquelas que são isoladas com maior frequência em todo o mundo, sendo responsáveis por cerca de 70-90% de todas as micoses invasivas (Pemán, 2014; Sampaio e Pais, 2014).

A lista de espécies de *Candida* atinge, hoje em dia, 150, sendo que destas apenas aproximadamente 17 desenvolveram a capacidade de sobreviver, crescer e otimizar o seu metabolismo no hospedeiro humano. Destas últimas, apenas 5 são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas invasivas (IFI) detectadas: *C. albicans*, *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*), *C. glabrata*, *Candida krusei* (*C. krusei*) e *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*). Esta lista tem tendência a crescer devido ao grande avanço verificado nas metodologias micológicas de detecção (Espinosa e Microbiología, 2010; Jandric e Schüller, 2011).

A detecção de um fungo endógeno no Homem como *C. glabrata* pode significar que estamos perante colonização ou infecção, sendo que esta última pode ser local (afectando principalmente as mucosas) ou invasiva (Cornistein, Mora, Orellana, e Javier, 2014). Assim podem abranger desde infecções mucocutâneas até infecções invasivas com envolvimento de qualquer órgão e elevadas taxas de mortalidade. A candidose invasiva é, de facto, uma infecção relacionada com os avanços técnico-científicos da medicina e das ciências farmacêuticas actuais, sendo por isso, as que carecem de maior foque (Párola, 2011). Afectam principalmente pacientes hospitalizados por longos períodos de tempo, que sofreram tratamentos invasivos, cirurgia abdominal, que apresentam neutropénia, transplantados e expostos a antibióticos (ATB) de largo espectro (Cornistein et al., 2014; Garcia-Vidal e Carratalà, 2012).

Em contraste com as outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* não é dimórfica, consequentemente é encontrada na forma de blastoconídios. Apesar de tanto *C. albicans* como *C. glabrata* só crescerem associadas a mamíferos como hospedeiros e apresentarem

parecenças a nível da sua vida comensal, a análise da sua sequência genética demonstra que pertencem a ancestrais diferentes. Dependendo da região do globo a que nos referimos *C. glabrata* encontra-se na maior parte dos casos em 2º ou 3º lugar nos patógenos mais comuns envolvidos no desenvolvimento de candidoses, logo após *C. albicans* (Jandric e Schüller, 2011; Jr, Vazquez, Sobel, e Fidel, 1999).

Apesar do aumento das infecções fúngicas e da sua disseminação rápida, estas são muitas vezes desvalorizadas quando comparadas com as infecções bacterianas. No que diz respeito a estas últimas, quer a prevenção, quer a utilização responsável da antibioterapia têm sido alvo de estudos aprofundados. Algumas doenças fúngicas apresentam mortalidade bastante elevada, sendo os fungos responsáveis, a nível mundial, pela morte de tantas pessoas como a tuberculose ou a malária (Brunke e Hube, 2013).

A minha escolha recaiu sobre este tema tendo por objectivo contribuir para uma maior divulgação do mesmo e alertar os profissionais de saúde e a população em geral, para a falta de procedimentos padrão nesta área que, caso existissem, poderiam evitar complicações clínicas a nível hospitalar, podendo salvar vidas.

De modo a prevenir e controlar as IFI é necessário, em primeiro lugar, identificar os grupos de pacientes que apresentam maior predisposição, determinar factores de risco para o seu desenvolvimento e analisar o perfil epidemiológico de cada género e espécie assim como os antifúngicos aos quais cada espécie é resistente de modo a adaptar o tratamento de acordo com os resultados (Cornistein et al., 2014; Pemán, 2014).

Biologia do género *Candida*

O género *Candida* apresenta uma elevada capacidade adaptativa e pode desenvolver-se na presença ou ausência de oxigénio podendo reproduzir-se de forma sexuada ou assexuada, sendo esta última a mais recorrente (Giolo, Inez, e Svidzinski, 2010).

Candida spp. são classificadas taxonomicamente no reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae* (Giolo et al., 2010).

Originalmente classificada no género *Torulopsis* como *Torulopsis glabrata*, devido à ausência de produção de hifas, esta espécie é hoje classificada como *Candida* pois em 1978 esta característica mostrou não ser um factor distintivo dos membros deste género, tendo sido proposta a alteração da sua classificação. Contrariamente aos restantes membros desta família *C. glabrata* apresenta ainda diferenças significativas como o facto de não ser dimórfica crescendo como blastoconídios, sendo estes significativamente mais pequenos que os de *C. albicans* (Silva et al., 2012).

As figuras 1, 2 e 3 mostram preparações a fresco de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* todas visualizadas com amplificação 400x. Pela análise das imagens é evidente que os blastoconídios de *C. glabrata* apresentam menor tamanho que os de *C. albicans*.

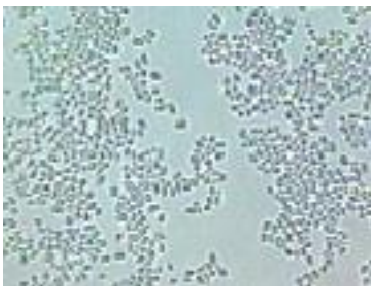


Figura 1: Imagem microscópica de *C. glabrata* ampliação 400x. Fotografia de autor.

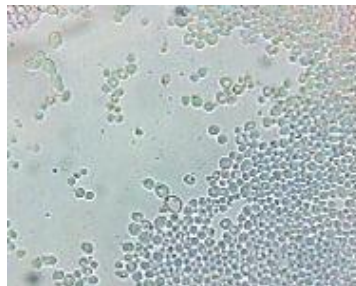


Figura 2: Imagem microscópica de *C. albicans* ampliação 400x. Fotografia de autor.

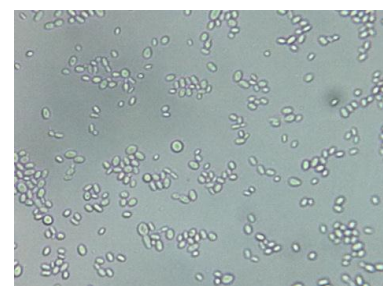


Figura 3: Imagem microscópica de *C. krusei* ampliação 400x. Fotografia de autor.

É impossível descrever esta espécie relativamente recente como causa de infecções graves no Homem, sem fazer comparação com a espécie mais comum e mais frequentemente

isolada, *C. albicans*. O seu genoma haplóide, as suas células mais esféricas que alongadas, a ausência de tubos germinativos e a sua capacidade de fermentar apenas glucose e trealose permitem uma fácil distinção de *C. albicans* (Silva et al., 2012). Outra característica que diferencia esta espécie de *Candida* é o seu crescimento relativamente lento em meio de cultura, requerendo 48h de incubação para o seu crescimento ser completo (Kiraz et al., 2010).

Caracterizada por colónias pequenas, brilhantes, convexas e de superfície lisa quando inoculada em meio de *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), *C. glabrata* é a única do seu género que não forma pseudohifas a temperaturas superiores a 37°C. Meios selectivos e diferenciais, de que são exemplo os meios cromogénicos, foram desenvolvidos e a sua utilização permite a identificação presuntiva das espécies de *Candida* através da coloração específica das colónias (Figura 4), contudo pode ser necessária a realização de provas de assimilação dos açúcares para confirmar a identificação de espécie (Jr et al., 1999; Minami, 2003).

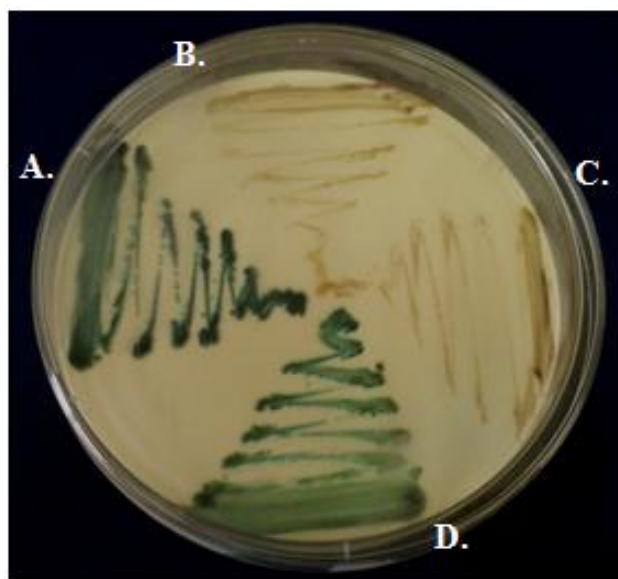


Figura 4: Meio cromogénico com colónias de diferentes espécies de *Candida*. Fotografia de autor. A. *C. albicans*; B. *C. glabrata*; C. *C. krusei*; D. *C. tropicalis*. Fotografia de autor.

Os testes rápidos de identificação têm como base a capacidade de *C. glabrata* hidrolisar as moléculas de trealose em duas de glicose. A trealase, enzima responsável pela hidrólise específica de trealose é encontrada noutras espécies além de *C. glabrata*, no entanto não

com uma acção tão rápida. Nestes testes utiliza-se uma suspensão de elevada densidade com o microrganismo e verifica-se após incubação que a glicose gerada por acção da trealase é detectada por reacção colorimétrica (Zilli, 2006).

Epidemiologia e factores de risco

Segundo, Oren e Paul, 2014, *Candida* spp. é hoje em dia o 4º género mais comum em infecções fúngicas da corrente sanguínea, em vários países, e o mais comum em IFI, principalmente devido à maior complexidade dos cuidados de saúde.

A incidência global de candidose tem vindo a aumentar de forma preocupante, sendo a grande diferença notada na última década. Na Tabela 1 podem observar-se dados recolhidos de diversos estudos realizados ao longo dos últimos anos, em que podemos observar que mesmo em diferentes tipos de infecções por *Candida*, *C. albicans* mantém-se como a mais prevalente. Hoje em dia *C. albicans* ainda é responsável por um elevado número de infecções tendo este vindo a diminuir.

Tabela 1: Estudos epidemiológicos seleccionados de 2000 a 2010, com dados sobre a distribuição de espécies de *Candida* em vários tipos de candidoses. Adaptado de (Silva et al., 2012).

| Candidoses | Referências | Período de observação | Região/país | Número de estirpes | <i>C. albicans</i> (%) | <i>C. tropicalis</i> (%) | <i>C. parapsilosis</i> (%) | <i>C. Glabrata</i> (%) |
|----------------|--------------------------------|-----------------------|-------------|--------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|
| Candidose oral | González Gravina et al. (2007) | Fevereiro- Maio 2003 | Venezuela | 43 | 42.3 | 12.8 | 14.9 | 2.1 |
| | Martins et al. (2010) | Maio 2005-06 | Portugal | 53 | 79 | 4.8 | 6.5 | 4.8 |
| | Lunque et al. (2009) | - | Argentina | - | 60.7 | 4.5 | - | 5.6 |
| Candidúria | Kauffman et al. (2000) | - | EUA | 530 | 51.8 | 7.9 | 4.1 | 15.6 |
| | Kobayashi et al. (2004) | - | Brasil | 45 | 35.5 | 22.3 | 11.1 | 8.8 |
| | Passos et al. (2005) | - | Brasil | 43 | 70 | 4.6 | 4.6 | 7 |
| | Binelli et al. (2006) | 1999-2001 | Brasil | 23 | 52 | 43.5 | - | 17.3 |
| | Chen et al. (2008) | Junho- Agosto 2006 | Austrália | 65 | 85.2 | - | 4.4 | 27.8 |
| | Álvarez-Lerma et al. (2003) | 1998-99 | Espanha | 389 | 68.4 | 36 | 0.5 | 8.2 |
| | Dorko et al. (2002) | - | Eslováquia | 94 | 61.7 | 6.3 | 24.5 | - |

| | | | | | | | | |
|----------------|---------------------------------|-----------|-------------------------|------|------|-----|------|------|
| Candidé mia | Hazen et al. (1986) | - | EUA | 126 | 21 | 38 | 12 | 3 |
| | Chakrabarti et al. (2009) | - | Índia | - | 26.3 | - | - | 10.5 |
| | Colombo et al. (2007) | - | Brasil | 282 | 38 | 48 | 23 | 9 |
| | Costa-de-Oliveira et al. (2008) | 2004 | Portugal | - | 35 | - | 26.5 | - |
| | Basetti et al. (2006) | 1999-2003 | Itália | 182 | 40 | 9 | 23 | 15 |
| | Miranda et al. (2009) | 2004-05 | Brasil | - | 42 | 33 | 16 | 2 |
| | Tortorano et al. (2006) | 1997-99 | Europa | 473 | 53 | 7 | 14 | 14 |
| | Trick et al. (2002) | 1999 | EUA | - | 59 | 10 | 11 | 12 |
| | Pfaller et al. (2010) | 2008-09 | Europa/Ásia/A mérica | 1239 | 50 | 9.8 | 17.4 | 17.4 |

- :não mencionado.

Actualmente, aproximadamente metade dos casos de candidose são provocados por espécies não *albicans*, sendo que *C. glabrata* já representa o segundo fungo mais comumente isolado em amostras de sangue (Espinosa e Microbiología, 2010; Oren e Paul, 2014; Sampaio e Pais, 2014). Num estudo por (Gołaś, Netsvyetayeva, Sikora, e Piskorska, 2014) os dados revelam que *C. glabrata* foi isolada em 44,4% das IFI, o que corrobora os resultados obtidos em diversos estudos. Porém, devido às limitações dos métodos de diagnóstico destas infecções é possível afirmar que a verdadeira epidemiologia e incidência de candidoses invasivas é pouco precisa (Guinea, 2014).

A principal fonte de infecção por *C. glabrata* é endógena, uma vez que esta espécie pode colonizar a pele e as mucosas, podendo a transmissão ocorrer também através de material infectado, técnicos de saúde ou através de outros pacientes. A supressão da flora bacteriana comensal do trato gastrointestinal como resultado da administração de antibacterianos de largo espectro, facilita a proliferação de leveduras no tubo digestivo e com isto aumenta o risco da passagem destas por fenómenos de translocação para a corrente sanguínea através do epitélio intestinal (Pemán, 2014). Contudo, os pacientes também podem ser infectados por fontes exógenas. Isolados exógenos podem colonizar a pele, cateteres intravenosos e local de infusões parentais, o que leva muitas vezes à colonização, pela mesma amostra, de

vários pacientes. A transmissão horizontal de isolados exógenos entre pacientes internados na mesma unidade hospitalar aumenta a frequência de candidoses invasivas (Guinea, 2014).

Historicamente esta espécie tem sido considerada saprófita e com baixo poder patogénico, pensando-se não infectar de forma significativa os seres humanos. Contudo a banalização do uso de fármacos imunossupressores, antibióticos de largo espectro e Azóis para tratamento antifúngico levou a um isolamento mais frequente de *C. glabrata* (Silva et al., 2012). A infecção pelo Vírus da imunodeficiência humana (VIH) e por outro lado a melhoria dos métodos de diagnóstico e terapêutica, com várias modalidades terapêuticas de suporte vital avançado e o implante de dispositivos protésicos com cateteres vasculares apresentam-se também como importantes factores contribuintes, como podemos observar na Tabela 2 (Espinosa e Microbiología, 2010).

Tabela 2- Epidemiologia da infecção por *C. glabrata*. Adaptada de (Jr et al., 1999).

| |
|---|
| Predominantemente nosocomial (excepto vaginal) Hospedeiros imunocomprometidos ou debilitados |
| Factores de risco específicos: -Hospitalização prolongada -Utilização prévia de antibiótico -Uso de fluconazol Uso generalizado no hospital Exposição do paciente -Transporte através das mãos pelos profissionais de saúde Frequentes infecções fúngicas mistas |

Na Europa, estudos apontam para uma prevalência de 14% de infecções por *C. glabrata*, sendo que esta apresenta maior taxa de mortalidade quando comparada com *C. albicans*. *C. glabrata* apresenta uma taxa de sobrevivência menor, em 90 dias, após diagnóstico, do que *C. albicans* (Miyazaki e Kohno, 2014).

A sua incidência em Espanha varia entre 0.2-10/1000 hospitalizações/ano. Isto traduz-se numa incidência de 0.73/10000 pacientes/dia que demonstra ser um pouco mais elevada que noutros países da Europa como a Noruega (0.27), França (0.35) e Suíça (0.54), sendo apenas ultrapassada pela Holanda e EUA (0,75 e 1,5, respectivamente) (Espinosa e Microbiología, 2010).

A incidência de candidose invasiva expressa em casos por 100.000 habitantes é na Europa de 8 casos por 100.000 habitantes em média, resultado de vários estudos realizados (Guinea, 2014).

Apesar de diferentes espécies de *Candida* serem responsáveis por candidoses invasivas, apenas *C. glabrata* e *C. krusei* estão a aumentar nalgumas zonas geográficas. A emergência de *C. glabrata* como a mais prevalente entre as espécies não *albicans* não é surpreendente uma vez que possui capacidade de desenvolvimento de resistência aos Azóis e dissemina-se como resultado do uso de fluconazol e itraconazol como terapêutica profilática preferencial e empírica, em alguns casos de forma indiscriminada (Gołaś et al., 2014).

As características dos pacientes também influenciam a distribuição das espécies sendo que infecções por *C. glabrata* são mais comuns em pacientes em estado crítico, idosos, sendo nestes casos, causadora de 1/3 das infecções sistémicas (Lewis, Viale, e Kontoyiannis, 2012; Oren e Paul, 2014).

A distribuição das diferentes espécies de *Candida* spp. causadoras de candidose variam de acordo com as diferentes áreas geográficas e, dentro da mesma localização, variam nas diferentes unidades hospitalares. Isto leva-nos a concluir que além da influência das condições em que se encontram os pacientes e do AF que lhes é administrado, também a área geográfica influencia a frequência de cada espécie causadora de candidose (Guinea, 2014).

Informação fornecida pelo estudo de vigilância antifúngica global ARTEMIS DISK, sendo esta recolhida em 39 países, mostra que apenas 5 espécies são responsáveis por 92% de todos os casos de candidose (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*). A espécie mais ou menos prevalente altera-se, como já referido, nas diferentes localizações em que se realizaram estudos, como podemos observar na Figura 5 (Guinea, 2014)

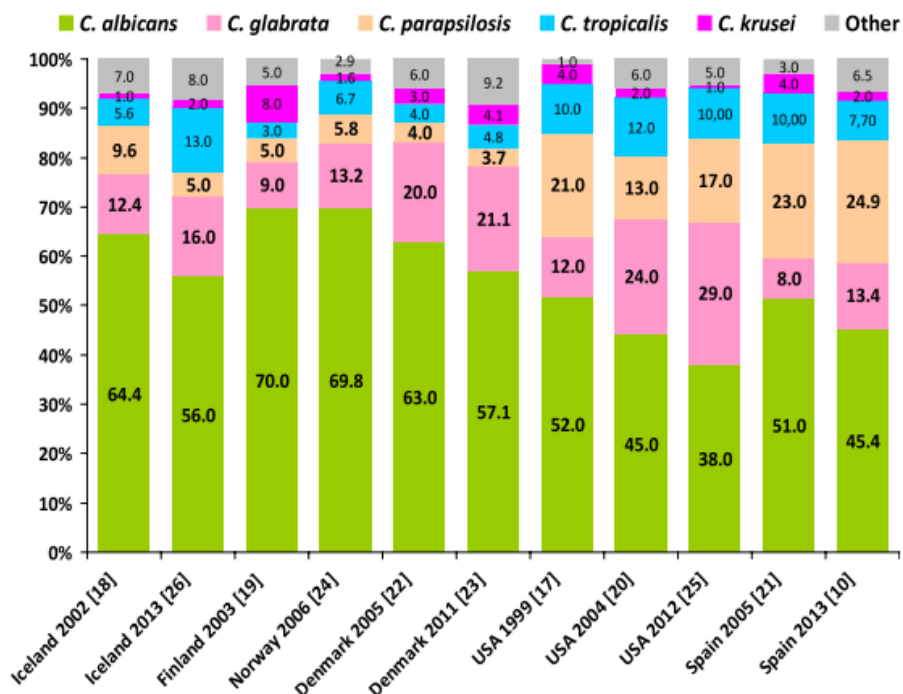


Figura 5: Dados de estudos de base populacional com a proporção das espécies mais relevantes de *Candida* causadoras de candidose. Adaptado de (Guinea, 2014).

Assim, pela análise do esquema, as infecções por *C. glabrata* têm maior expressão nos EUA e países do norte da Europa, embora seja transversal a maior frequência de *C. albicans* em todas as localizações. Em contraste resultados de Espanha e Brasil demonstraram menor número de infecções por *C. glabrata* e maior número por *C. parapsilosis*. Os mesmos resultados são apresentados por (Sampaio e Pais, 2014) em que na Europa o crescimento de infecções por *C. glabrata* não foi tão acentuado como nos EUA, apesar de um igual aumento na utilização de fluconazol (Figura 6 A).

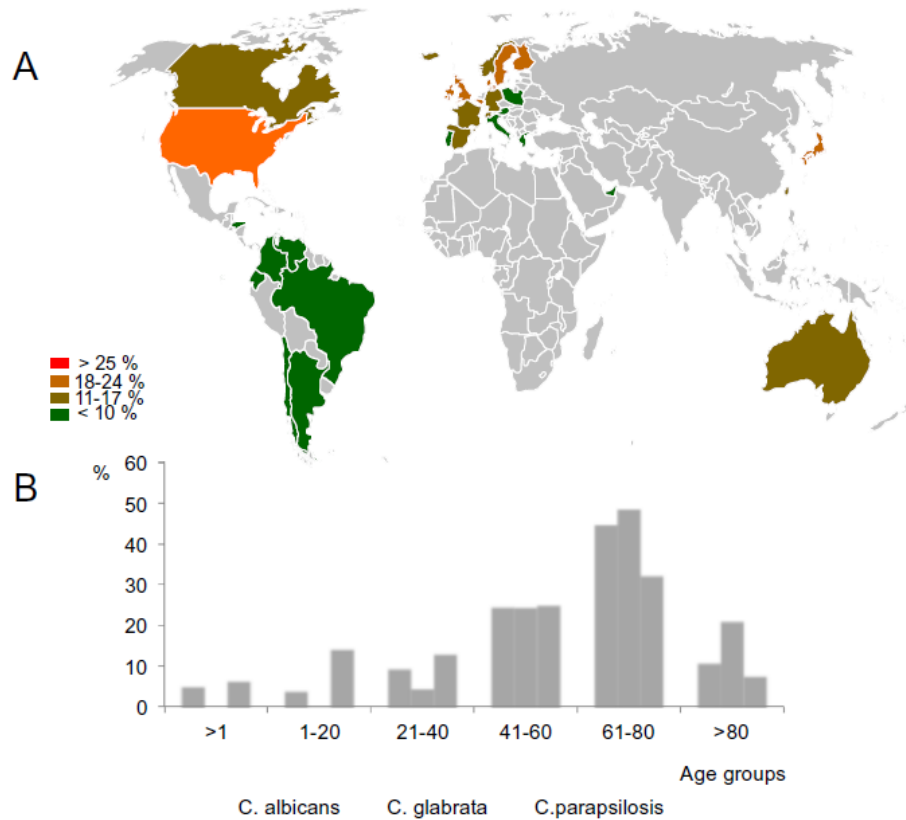


Figura 6: **A.** Variação geográfica de *C. glabrata* isolada de candidoses invasivas. **B.** Distribuição das principais espécies de *Candida* de acordo com a faixa etária do paciente. Dados recolhidos de um estudo populacional. Adaptada de (Sampaio e Pais, 2014).

A explicação para este facto é ainda desconhecida, mas pensa-se poder ser uma consequência do impacto do clima, política de utilização antifúngica ou estar ligada aos procedimentos dos cateteres venosos centrais (Guinea, 2014).

Outra das razões pode estar também relacionada com a idade do doente. A incidência altera-se entre adultos e crianças. Curiosamente a frequência de *C. parapsilosis* diminui com a idade, enquanto *C. glabrata* aumenta com o avançar da mesma (Guinea, 2014). Quando nos referimos à percentagem de infecções por espécies resistentes aos Azóis como *C. kruszei* e *C. glabrata*, esta é muito menor em recém-nascidos, muito provavelmente devido à reduzida taxa de utilização de Azóis nesta faixa etária. Estudos mostraram que pacientes com idades superiores a 60 anos não só apresentavam risco aumentado de candidose mas também de morrer da infecção (Figura 6 B) (Sampaio e Pais, 2014).

O estado em que o paciente se encontra a nível clínico influencia igualmente a distribuição e frequência de *Candida* spp. independentemente da região em que nos encontramos. Em conjunto estes estudos apontam para que a exposição prévia aos Azóis não é o único nem mais importante factor predisponente para ocorrência de infecção por *C. glabrata* (Sampaio e Pais, 2014).

Comparando as infecções por *Candida* em pacientes admitidos nas UCIs com os admitidos noutros serviços hospitalares, não foram encontradas diferenças significativas nas espécies encontradas entre os dois locais, sendo isto um indicador de que as infecções nas UCIs reflectem as infecções que ocorrem no restante hospital (Guinea, 2014).

Diversos factores podem contribuir para as diferenças na distribuição geográfica, doenças subjacentes do paciente, cateteres vasculares e uso prolongado de antimicrobianos têm um efeito considerável na epidemiologia local, mas é importante ter em conta que os diferentes *designs* dos estudos e a população-alvo dos mesmos também influenciam os resultados (Sampaio e Pais, 2014).

Os factores de risco para doentes hemato-oncológicos são semelhantes aos dos restantes doentes, podendo estar relacionados com o hospedeiro, com a doença da qual sofrem e o seu tratamento e com as complicações que daí advêm. Nestes doentes, significativamente mais susceptíveis às IFI, os sintomas podem variar de quadros febris pouco específicos até um quadro de sepsia indistinguível de um de origem bacteriana (Vallejo e Ruiz-camps, 2014).

No que diz respeito à mortalidade associada a infecções pelo género *Candida* estima-se que apresente valores entre 30-60% (Espinosa e Microbiología, 2010). Segundo Guinea, 2014, a mortalidade entre os adultos varia entre 15-35% e de 10-15% em recém-nascidos, sendo também importante referir que cada episódio de candidose resulta num aumento significativo do custo de hospitalização.

As taxas de mortalidade inicial (7 dias após diagnóstico) ou tardia (30 dias após diagnóstico) são diferentes, 13 e 30% respectivamente. Enquanto a mortalidade inicial está associada a ausência de terapêutica antifúngica adequada e pronta remoção de cateteres centrais venosos, a mortalidade tardia é causada normalmente pela condição clínica dos

pacientes. A taxa de mortalidade está definitivamente relacionada com a demora no início do tratamento apropriado com AF. O tratamento pode ser considerado incorrecto em diversas situações, ausência de tratamento, atraso no seu início ou utilização de AF sem actividade para aquele patógeno. Por essa razão, os esforços para minimizar estas situações deverão representar uma solução de modo a diminuir a mortalidade de infecções por *Candida* spp. (Guinea, 2014). Assim, o conhecimento sobre as espécies de *Candida* spp. responsáveis pela infecção facilita a selecção apropriada do AF no caso de se tratar de implementação de terapêutica empírica (Guinea, 2014).

Estudos de vigilância revelaram que durante a última década, apesar do contínuo aumento de doentes imunocomprometidos a mortalidade associada a infecções por *Candida* spp. tem-se mantido estável, a uma taxa de aproximadamente 0.4 mortes por 100.000 habitantes (Sampaio e Pais, 2014).

Patogenicidade e factores de virulência

O desenvolvimento de micoses sistémicas ocorre, mais frequentemente, em pacientes com o sistema imunitário debilitado sendo estes, pacientes com cancro, transplantados, doentes em quimioterapia ou internados em UCIs, assim como recém-nascidos e idosos (Tscherner, Schwarzmüller, e Kuchler, 2011). Tomando como exemplo os doentes hemato-oncológicos, o risco de infecção a que estão expostos depende do nível de imunodepressão do doente e estágio da doença. A presença ou desenvolvimento de neutropénia apresenta-se como factor chave para o desenvolvimento de IFI aumentando também outros factores de risco, uma vez que, a mucosite associada aos tratamentos de quimioterapia aumenta o risco de translocação de *C. glabrata* através do trato gastrointestinal (Walsh e Gamaletsou, 2013). A translocação ocorre através da mucosa do trato gastrointestinal sendo o patógeno transportado de imediato para o fígado, o qual é eficaz na filtração de fungos (Clancy e Nguyen, 2013). Assim, o trato alimentar é o principal portal de entrada de *C. glabrata* em pacientes com leucemia aguda, uma vez que fazendo parte da flora microbiana normal do hospedeiro, entra na corrente sanguínea devido a falhas nas barreiras anatómicas (Walsh e Gamaletsou, 2013).

Quando nos referimos a *C. glabrata* deve ter-se em conta a necessidade de conhecer os seus mecanismos de patogenicidade e o que a nível genético levou esta espécie a transitar de comensal a patógeno, de modo a melhorar ou adequar a terapêutica instituída (Tscherner et al., 2011).

A organização do seu genoma sugere uma relação de sistenia (conservação da ordem dos segmentos cromossómicos entre duas espécies) com o modelo não patogénico bem conhecido *S. cerevisiae*. *C. glabrata* evoluiu e conquistou uma característica que a diferencia deste, característica essa que se prende com a capacidade de sobrevivência em mamíferos. Diferentes traços como a adesão, a elevada resistência a fármacos e a capacidade aumentada para sobreviver à falta de nutrientes permitem que *C. glabrata* exista não só como comensal mas também como patógeno oportunista. Apesar de possuir a maquinaria necessária à reprodução sexuada, *C. glabrata* não desenvolve o seu ciclo sexual e todos os isolados clínicos até à data identificados são haplóides. Depreende-se portanto a importância da plasticidade genómica para a evolução das populações de *C. glabrata*.

Alguns autores especulam se a ausência de ciclo sexual é responsável pela tolerância aos frequentes rearranjos cromossómicos, fornecendo uma explicação para a notável diversidade na população clonal (Miyazaki e Kohno, 2014; Tscherner et al., 2011).

Enquanto *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são relativamente semelhantes, partilhando uma única troca de codão de leucina para serina, *C. glabrata* apresenta no seu genoma parencas principalmente com *S. cerevisiae*. Isto traduz-se, por exemplo, num ancestral diferente que sofreu duplicação completa do genoma, e no facto de *C. albicans* ser um fungo polimórfico que muda da sua forma de levedura para a produção de hifas e pseudohifas e também ser diplóide, em tudo distinto de *C. glabrata* que apenas cresce sob forma de levedura e é estritamente haplóide (Brunke e Hube, 2013). *C. glabrata* tem como principal habitat as mucosas de mamíferos, sendo que estas estão associadas a nutrientes limitados, *stress* oxidativo, competição com outros microrganismos e *stress* causado por mecanismos de defesa. Outros patógenos perante estas ameaças produziram esporos resistentes ao *stress* através do seu ciclo sexual, uma vez que *C. glabrata* não utiliza esta via, é então incapaz de os produzir (Jandric e Schüller, 2011).

Adesão à superfície do hospedeiro ou dispositivos médicos revela-se essencial para a colonização inicial e persistente dos mesmos. *C. glabrata* alberga no seu genoma um vasto grupo de proteínas glicosilfosfatidilinositol (*GPI*) ancoradas na parede celular, muitas delas são potenciais adesinas (Miyazaki e Kohno, 2014; Tscherner et al., 2011).

C. glabrata adquiriu um mecanismo de adesão único, mediado principalmente por genes da família *EPA*, pelo menos 23 localizados nas regiões subteloméricas. A manutenção da estrutura telomérica onde se localizam os genes *EPA* e a regulação de mecanismos de silenciamento parecem desempenhar um papel fulcral na formação de biofilmes por *C. glabrata* (Riera, Mogensen, d'Enfert, e Janbon, 2012). Esta localização dos genes *EPA* faz com que estes estejam sob controlo de maquinaria silenciadora dependente da cromatina. Esta maquinaria parece depender de ortólogos de *S. cerevisiae* incluindo *RAP1*, *SIR2*, *SIR3*, *SIR4* e *RIF1*. Os genes *SIR3* e *RIF1* quando ausentes induzem a expressão de *EPA1*, *EPA6* e *EPA7* o que facilita a sua adesão às células epiteliais (Tabela 3).

Tabela 3: Genes de *C. glabrata* implicados na sua patogenicidade e virulência. Adaptada de (Tscherner et al., 2011).

| Gene | Expressão fenotípica |
|-----------------------------|--|
| Família <i>EPA</i> gene | Adesão, colonização de órgãos e formação de biofilme |
| <i>SIR3, RIF1</i> | Adesão e colonização do rim |
| Família de genes <i>YPS</i> | Adesão |
| <i>ACE2</i> | Hipervirulência |
| <i>AR08</i> | Pigmentação, resistência ao <i>stress</i> oxidativo |
| <i>CTA1</i> | Resistência ao <i>stress</i> oxidativo |
| <i>ATG11, ATG17</i> | Sobrevivência à fagocitose |
| <i>PDR1</i> | Resistência aos Azóis; virulência aumentada e colonização de órgãos |
| <i>CDR1, CDR2, SNQ2</i> | Resistência aos Azóis |
| <i>FKS1, FKS2</i> | Resistência às equinocandinas |

C. glabrata e *C. albicans* possuem adesinas específicas que dependem de sinais distintos para detectar a presença dos seus receptores no hospedeiro. Enquanto diferem nos detalhes, ambas as espécies partilham o mesmo princípio, quando detectam um receptor no hospedeiro, as adesinas são expressas de modo a se ligarem às células do hospedeiro (Brunke e Hube, 2013). *In vitro* a adesão de *C. glabrata* ao tecido epitelial é essencialmente mediada pela lectina *EPA1*, enquanto outros genes *EPA* são expressos em menor quantidade (Riera et al., 2012).

A família de genes *EPA* é similar à das lectinas/floculinas (responsáveis pela agregação entre moléculas durante a fermentação) codificadas pelos genes *FLO* em *S. cerevisiae*. Além desta também foram identificadas na parede celular de *C. glabrata* proteínas semelhantes às adesinas envolvidas na adesão e desenvolvimento de biofilme (Riera et al., 2012). Os biofilmes representam uma das estratégias de resistência de *C. glabrata*, pois diminuem a sua sensibilidade a diversos AF e originam infecções persistentes (Riera et al., 2012; Tscherner et al., 2011).

C. glabrata tem a capacidade de colonizar os tecidos do hospedeiro assim como superfícies abióticas onde desenvolve complexas estruturas de biofilme. A formação deste envolve interações célula-célula e célula-substrato, por isso a expressão de adesinas na superfície celular é essencial para o seu desenvolvimento, as adesinas *EPA6* e *EPA7* são as principais implicadas na formação de biofilmes por esta espécie. (Riera et al., 2012). A sua expressão é regulada por *YAKIP* cinase sendo que esta regulação depende da presença de maquinaria silenciadora subtelomérica intacta. Foram também identificados novos genes nesta espécie para os quais uma mutação insercional na região codificadora impede a correcta formação de biofilme (Riera et al., 2012).

A patogenicidade de *C. glabrata* parece ser independente da sua morfologia, contudo tanto *C. glabrata* como *C. albicans* estão intimamente ligadas a infecções no Homem. A árvore filogenética na qual estas espécies estão separadas por inúmeras leveduras não patogénicas sugere que a capacidade para infectar o Homem evoluiu de forma independente entre elas (Brunke e Hube, 2013). Após a adesão, o passo seguinte na patogénese de *Candida* é a invasão, normalmente das camadas de células epiteliais. Infecções por *C. albicans* são caracterizadas por forte infiltração de neutrófilos e a sua flexibilidade morfológica entre levedura e forma filamentosa desempenha um papel crucial na fuga à fagocitose e na penetração no tecido hospedeiro. De um modo geral a presença de hifas e danos celulares no hospedeiro resultante de infecções por *C. albicans* origina uma resposta pro-inflamatória por meio de citocinas muito superior à causada por *C. glabrata* (Brunke e Hube, 2013). *C. glabrata*, por sua vez, não produz hifas e parece ser a adopção de uma postura furtiva e evasiva que permite a sua persistência no hospedeiro sem causar nenhuma resposta imunitária de relevo. Pensa-se que *C. glabrata* atinge a corrente sanguínea através de uma quebra nas barreiras naturais de forma accidental ou iatrogénica através de trauma, cateteres, cirurgia ou nutrição parentérica. Tem que se tomar em consideração que ainda que nenhuma destas alterações ocorra, *C. glabrata* continua a ter capacidade de invadir tecidos profundos (Brunke e Hube, 2013; Miyazaki e Kohno, 2014). Como referido por (Lewis et al., 2012) “Esta comporta-se de modo diferente das restantes espécies de *Candida* no teste clássico de infecção intravenosa em ratinhos. Uma infecção com uma grande quantidade de

inócuo de *C. glabrata* não é fatal para um ratinho imunocompetente, tem um efeito considerável nos rins do animal, sendo esta suportada com mínima inflamação.”.

É possível que *C. glabrata* utilize uma estratégia semelhante a *C. neoformans* utilizando os macrófagos como “cavalos de Tróia” resguardando-se no seu interior para evitar a acção do sistema imunitário do hospedeiro e conseguir disseminar-se, sendo possível concluir que esta espécie possui uma maior capacidade de evasão o que pode favorecer a sua persistência e emergência como patógeno *multi-drug resistance* (MDR). *C. glabrata* é reconhecida e ingerida por macrófagos a uma taxa muito superior a *C. albicans*, e esta última é mais rapidamente reconhecida na sua forma de levedura do que em hifas. Estas preferências parecem estar dependentes do manano (Brunke e Hube, 2013). Enquanto *C. albicans* utiliza a capacidade de formação de hifas para escapar ao interior dos macrófagos, *C. glabrata* depende da autofagia, mecanismo de mobilização intracelular de nutrientes através da reciclagem de componentes celulares e organelos, que hoje em dia se sabe ser a estratégia de sobrevivência utilizada pela *C. glabrata* durante a fagocitose (Brunke e Hube, 2013).

Quando *C. glabrata* atinge o interior dos macrófagos modifica a maturação normal dos fagolisossomas. Como *Histoplasma capsulatum* ou *Mycobacterium* spp., *C. glabrata* não só sobrevive como desenvolve o seu ciclo de replicação dentro do fagossoma, até o fagócito rebentar.

Uma sequenciação completa do genoma de *C. glabrata* mostra que esta apresenta uma redução no número de genes quando comparado com *S. cerevisiae*. Esta evolução redutiva parece estar associada à capacidade de adaptação desta espécie à sua vida como microrganismo comensal (Jandric e Schüller, 2011). Apesar de *C. glabrata* conter no seu genoma ortólogos de quase todos os genes de *S. cerevisiae*, são observadas alterações aleatórias que incluem a perda de cromossomas, translocações e aneuploidia (alteração genética no número de cromossomas). Estas dinâmicas genómicas

também se reflectem no elevado número de sequências de minissatélites encontrados no genoma de *C. glabrata*. São encontradas frequentemente em espécies fúngicas patogénicas e não-patogénicas repetições em tandem e amplificações selectivas de domínios. O mecanismo evolucionário e a origem de minissatélites mantem-se pouco clara, mas um elevado número de genes de adesão *EPA* apresentam as mesmas repetições. Uma hipótese plausível é que estes minissatélites estejam relacionados com os recorrentes rearranjos cromossomais, sendo que estes iriam aumentar a expressão da diversidade bem como o funcionamento dos genes de adesão, os quais são considerados importantes para a patogenicidade desta espécie (Tscherner et al., 2011).

Entre as perdas, é de realçar a perda de genes envolvidos no metabolismo da galactose, fosfato, nitrogénio e enxofre. Este processo evolucionário deixa *C. glabrata* numa situação de dependência do hospedeiro no que diz respeito a estes nutrientes (Miyazaki e Kohno, 2014; Tscherner et al., 2011).

Sendo um ponto fulcral para o estabelecimento e manutenção de uma infecção, a obtenção de nutrientes por parte do fungo, torna-se essencial. Devido às inúmeras alterações que sofreu, muitas das vias metabólicas conhecidas noutros fungos encontram-se ausentes em *C. glabrata* (Brunke e Hube, 2013).

Esta obtenção pode ser facilitada pela ocorrência de co-infecções por *C. glabrata* e *C. albicans*. Os danos efectuados por outros fungos no hospedeiro podem representar uma mais-valia para *C. glabrata* uma vez que esta aproveita os nutrientes e pode ainda ganhar acesso à corrente sanguínea (Brunke e Hube, 2013).

Os micronutrientes são particularmente importantes, especialmente metais como o ferro (Fe) e o zinco (Zn). O Zn é essencial uma vez que é cofactor em muitas proteínas, encontrando-se também por isso limitado. *C. albicans* obtém este composto através do sistema “zicófero”, apenas recentemente descoberto, utilizando a proteína Pra1. Esta proteína liga e transporta o Zn de modo semelhante ao efectuado no transporte de Fe pelos sideróforos. No caso de *C. glabrata* esta não possui a proteína, pensa-se que obtém o Zn através de dois homólogos dos transportadores presentes em *S. cerevisiae*, contudo é necessária ainda confirmação experimental (Brunke e Hube, 2013).

O sistema imunitário do hospedeiro tem capacidade de sequestrar estes elementos de modo a limitar ao máximo o acesso dos patógenos. Para contornar este problema *C. albicans* possui inúmeros sistemas de aquisição de Fe, utiliza sideróforos de outros microrganismos e liga-se à transferrina e ferritina do hospedeiro. Contando com a capacidade de *C. glabrata* produzir hemolisinas *in vitro*, seria de esperar que assim como *C. albicans*, esta possuísse receptores para o heme contudo isto não se verifica, além disso, apesar da presença de via reductiva *C. glabrata* não utiliza transferrina/ferritina do hospedeiro como fontes de Fe, do que se conclui que as fontes em *C. glabrata* são significativamente mais limitadas (Brunke e Hube, 2013). A aquisição de ferro mediada por sideróforos mostrou-se ser crítica para as células de *C. glabrata* sobreviverem aos macrófagos, o que demonstra o desenvolvimento de vários mecanismos de aquisição de ferro por parte desta espécie (Miyazaki e Kohno, 2014).

Uma característica interessante de *C. glabrata* é o facto de ser auxotrófica para o ácido nicotínico (NA), o que significa que necessita deste nutriente para se desenvolver. Um mecanismo único para detecção do ambiente no hospedeiro foi descrito para genes codificadores de proteínas EPA na espécie *C. glabrata*. Este sistema necessita de NAD⁺ como cofactor e uma vez que *C. glabrata* é auxotrófica para o precursor de NAD⁺, o ácido nicotínico, a actividade silenciadora é indirectamente influenciada pelas concentrações externas de NA. Por na urina estarem presentes pequenas quantidades de NA, os genes EPA são activados no trato urinário promovendo a adesão de *C. glabrata* neste sistema. Pode mesmo dizer-se que a auxotrofia demonstra a adaptação co-evolutiva de *C. glabrata* ao hospedeiro humano (Brunke e Hube, 2013).

A adesão do patógeno despoleta espécies reactivas ao oxigénio (ROS) extracelulares para originar a morte do fungo invasivo. No caso de *C. glabrata* a falta de *CTAI* (gene que codifica a única catalase) resulta em hipersensibilidade ao H₂O₂. Contudo as estirpes de *C. glabrata* demonstram maior resistência ao peróxido que *S. cerevisiae* e *C. albicans*, o que sugere uma resistência intrínseca elevada ao stress oxidativo. Notavelmente, o número de peroxissomas no fagolisossoma diminui após um longo período de residência de *C.*

glabrata, talvez por via da autofagia, de modo a auxiliar *C. glabrata* a sobreviver num meio com baixa disponibilidade de nutrientes (Tschermer et al., 2011).

Quando se analisam dados de virulência provenientes de modelos de ratinhos há que ter em conta as inconsistências verificadas entre os diversos estudos. Segundo, Tschermer et al., 2011, os ratinhos devem ser utilizados preferencialmente como modelos *in vivo* para monitorizar o crescimento, disseminação e colonização de órgãos e tecidos uma vez que é necessária imunossupressão severa para obter morte do fungo. Contudo ratinhos imunocompetentes têm sido utilizados com sucesso no estudo da virulência ou fenótipos *in vivo*.

C. glabrata possui outras estratégias de sobrevivência como a produção de pigmentos. A pigmentação pode ter como função a protecção contra microrganismos patogénicos invasivos podendo ser, por isso, considerado como factor de virulência. Os pigmentos podem ter várias funções biológicas incluindo efeitos antioxidantes o que contraria o efeito de ROS produzidas pelo sistema imunitário do hospedeiro. *C. glabrata* era, até há pouco tempo, considerada uma espécie não pigmentada, contudo estudos recentes comprovam a produção de pigmentos derivados do indol. A produção destes depende da presença de triptofano como fonte de nitrogénio no meio. Curiosamente, a produção de pigmentos por *C. glabrata* é efectuada pela mesma via que *S. cerevisiae* utiliza para a degradação de aminas aromáticas (Tschermer et al., 2011).

Assim, podemos concluir que *C. glabrata* não causa danos epiteliais extensos devido à ausência de uma forma de crescimento invasiva, não origina uma resposta imunitária forte em modelos de roedores ou em reconstituições *in vitro* de epitélio humano e pode estar na presença de macrófagos sem os destruir de imediato uma vez que a ausência de morfogénese não lhe permite provocar a morte física das células do hospedeiro (Tschermer et al., 2011). *C. glabrata* desenvolveu estratégias (adesão e formação de biofilmes, capacidade de sobrevivência nos macrófagos, produção de pigmentos e sobrevivência com níveis limitados de nutrientes), distintas das adoptadas por outras espécies do mesmo género, que lhe permitiram tornar-se num patógeno oportunista de sucesso.

Diagnóstico de infecção por *C. glabrata*

É imprescindível para a instituição de terapêutica adequada, o correcto diagnóstico de infecções fúngicas de modo a obter melhores resultados para o doente. O ideal seria a existência de um teste que conseguisse com elevada fiabilidade fornecer a informação necessária aos profissionais de saúde, sendo necessário adoptar os parâmetros apresentados na Tabela seguinte (Clancy e Nguyen, 2013).

Tabela 4: Características de um teste ideal para o diagnóstico de candidose invasiva. Adaptado de (Clancy e Nguyen, 2013).

Parâmetros óptimos para realização do teste

- Mínimamente invasivo (amostra sanguínea em vez de tecido)
- Necessita de pequenas quantidades de amostra
- Rápido
- Requer mínimo trabalho e encaixa nas actividades normais de um laboratório microbiológico clínico
- Sensível e específico
- Oferece resultados sobre a espécie e susceptibilidade aos AF
- Capacidades múltiplas

Objectivos do teste

- Identificação rápida dos pacientes em início de candidose invasiva
- Identificar pacientes com candidose que tenham candidíase profunda
- Identificar pacientes com candidose que tenham probabilidade de desenvolver candidíase profunda
- Identificar pacientes que tenham candidíase profunda mas com culturas sanguíneas negativas
- Fornecer informação prognóstica

Uma vez que os métodos disponíveis estão longe deste ideal, o diagnóstico tem-se demonstrado complexo, sendo outra limitação a baixa especificidade das manifestações clínicas. Estas apenas se apresentam por volta da 3ª semana de hospitalização e não são distintas de qualquer outra infecção fúngica ou bacteriana. A baixa sensibilidade e relativa lentidão dos métodos tradicionais de diagnóstico microbiológico representam também um problema (Espinosa e Microbiología, 2010; Garnacho-Montero, Díaz-Martín, Ruiz-Pérez De Piappón, e García-Cabrera, 2012; Quindós, Eraso, López-Soria, e Ezpeleta, 2012).

Diagnóstico clínico

C. glabrata, como as restantes espécies de *Candida*, apresenta um largo espectro de infecções nos hospedeiros humanos, que pode ir desde a colonização da superfície da pele e

superfícies das mucosas até à invasão da corrente sanguínea com disseminação para os órgãos internos (Lewis et al., 2012). Os locais mais comuns de isolamento de *C. glabrata* são a cavidade oral, o trato vulvovaginal e urinário. Esta espécie pode ser isolada como comensal da cavidade oral, trato geniturinário, trato alimentar e respiratório (Silva et al., 2012).

O maior número de infecções por *Candida* spp. é reportado em UCIs, serviço de cirurgia e unidades de hematologia (Gołaś et al., 2014).

As infecções por *Candida* traduzem-se na maioria dos casos em “febre alta (39°C-40°C), podendo contudo ocorrer também febre baixa, hipotermia acompanhada por taquicardia, arrepios e nalguns casos surgem erupções cutâneas no tronco e extremidades que se assemelham a uma reacção anafiláctica, sendo que em 60% dos casos em que ocorre reacção na pele a infecção é provocada por *C. tropicalis*.”, como refere (Espinosa e Microbiología, 2010).

É de realçar que diferentes tipos de imunossupressão dão origem a tipos de infecções distintos. A imunossupressão está presente em pacientes com o vírus VIH onde existe grande susceptibilidade a infecções por bactérias e fungos oportunistas e também ao aparecimento de neoplasias. As manifestações da infecção por VIH afectam normalmente a zona da cabeça, pescoço e cavidade bucal (Moreira, Pereira, e García-zapata, 2011).

Assim, em pacientes HIV-positivos não é comum o desenvolvimento de candidoses ou candidíases profundas (com envolvimento de órgãos) (Cassone e Cauda, 2012). Contudo estes pacientes apresentam elevada probabilidade de desenvolvimento de neutropénia, linfopénia, exposição prolongada a ATB para profilaxia e tratamento de infecções bacterianas, sendo estes factores de risco para o desenvolvimento de infecções fúngicas mais invasivas, como as causadas por *C. glabrata* (Ochiabuto, Nwankwo, Enweani, e Okoye, 2014). Assim doentes que apresentem estes factores de risco ou que se encontrem internados têm a mesma probabilidade dos doentes neutropénicos sem infecção por VIH de desenvolverem candidoses invasivas.

A candidémia pode ser considerada uma forma de candidose sistémica prévia ao comprometimento de órgãos profundos, sendo comum nos pacientes imunocomprometidos

que esta infecção se dissemine através da corrente sanguínea (Espinosa e Microbiología, 2010).

Métodos de identificação laboratorial

O interesse pela aplicação de novas técnicas ao diagnóstico de infecções por *Candida* levou à criação de alguns grupos internacionais com a finalidade de criar técnicas e critérios que permitam padronizar os métodos utilizados para o diagnóstico, melhorando assim a sua fiabilidade (Quindós et al., 2012).

Métodos de diagnóstico convencional

O estudo macro e microscópico de tecidos, cultura em meios apropriados para isolamento do agente causal e a avaliação da resposta imunitária do doente representam métodos de diagnóstico micológico convencional (Quindós et al., 2012).

A morfologia macroscópica das colónias e microscópica do fungo e as suas propriedades bioquímicas, fisiológicas e imunológicas permitem realizar o diagnóstico da infecção fúngica (Quindós et al., 2012). Neste meio cromogénico *C. glabrata* apresenta colónias turquesa, brilhantes, lisas e com bordo linear, enquanto *C. krusei* se caracteriza por colónias turquesa de aparência seca com bordos irregulares (Figura 7).

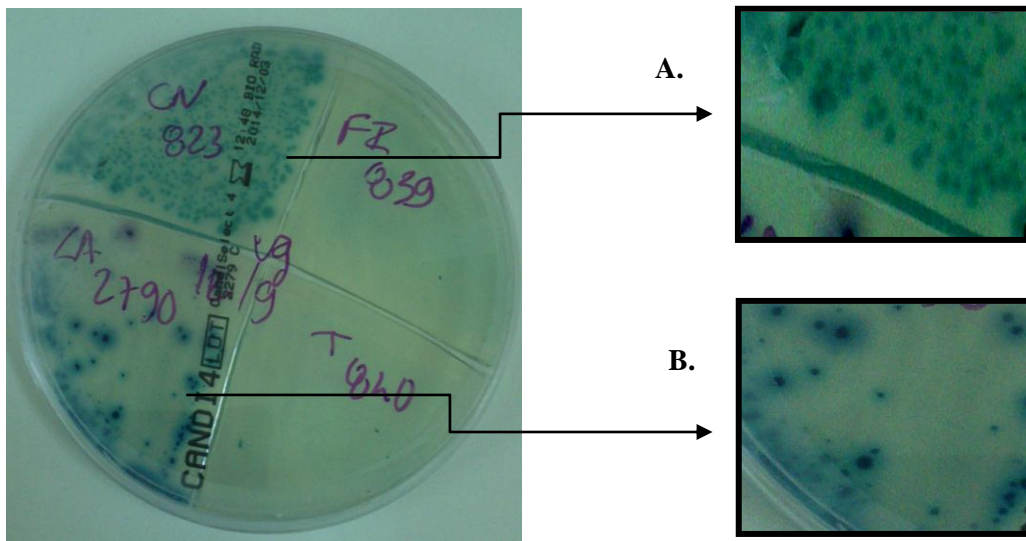


Figura 7: Placa com meio cromogénico para *Candida* spp.. A. Colónias de coloração turquesa de *C. glabrata*; B. Colónias de coloração turquesa com centro escuro correspondentes a *C. krusei*. Fotografia de autor.

Uma cultura, preferencialmente neste tipo de meio, permite encurtar o processo de identificação, sendo útil principalmente em caso de infecções mistas (Espinosa e Microbiología, 2010). Os meios cromogénicos representam um enorme avanço no diagnóstico de infecções por *Candida* pois a sua utilização permite a identificação presumtiva, com elevado nível de certeza de espécies como *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* com base na cor das colónias - Figura 7 - o que auxilia na escolha do AF adequado ao tratamento (Quindós et al., 2012).

A sensibilidade de um estudo microscópico depende de diferentes aspectos técnicos (ampliação utilizada, coloração e observação de todos os campos para identificação quando a concentração de microrganismo é baixa) e tem que se ter em conta que na maioria dos casos esta técnica não permite identificação da espécie, apenas do género devido à inespecificidade das características das estruturas fúngicas (Quindós et al., 2012). Enquanto algumas espécies de *Candida* produzem hifas, *C. glabrata* não apresenta esta característica, o que requer perícia na análise destas amostras, sendo que a interpretação e morfologia não pode ser usada para identificação definitiva (Sampaio e Pais, 2014).

Métodos como microscopia e histopatologia apresentam sensibilidade limitada para detecção de IC, e a sua utilidade depende da possibilidade de obter amostras de tecidos profundos, o que em muitos casos não é possível devido à necessidade de efectuar cirurgia ou outros procedimentos invasivos em doentes, muitas vezes, em estado crítico (Clancy e Nguyen, 2013; Sampaio e Pais, 2014). É por isso importante avaliar o benefício da análise histológica uma vez que, em alguns casos, pode ser demasiado invasiva e pouco específica para determinadas espécies fúngicas (Low e Rotstein, 2011). A técnica histopatológica é facilitada pela utilização de técnicas de coloração como Hematoxilina-Eosina e o *Periodic acid-Schiff* (PAS), estas realçam as estruturas celulares fúngicas e permitem determinar o tipo de fungo responsável pela infecção, uma vez que permite distinguir fungos leveduriformes de filamentosos ou produtores de hifas (Sampaio e Pais, 2014).

São também necessários técnicos experientes na sua análise uma vez que as amostras de tecidos recolhidas assepticamente devem ser processadas rapidamente e utilizadas tanto

para histopatologia (rapidamente colocadas em fixadores) como para cultura, e a sua correcta observação depende da elevada densidade de fungos no tecido sendo que isto ocorre, normalmente, quando os danos provocados no tecido são graves e irreversíveis (Quindós et al., 2012; Sampaio e Pais, 2014).

Quando existe suspeita de candidose devem ser efectuadas hemoculturas que visem a cultura em aerobiose e anaerobiose antes de se iniciar a terapêutica, sendo que *C. glabrata* tem a sua detecção facilitada em meio anaeróbico (Ruhnke, 2014). Há que ter em conta que uma hemocultura negativa pode apenas reflectir a ausência de *Candida* na circulação ou a presença em concentrações inferiores às detectáveis devido ao curto espaço de tempo em que células viáveis de *Candida* se mantêm no sangue (Clancy e Nguyen, 2013). Apesar das hemoculturas se terem revelado um método pouco eficaz e moroso, sendo necessários entre 3 a 8 dias para obter resultados positivos, e se estimar que aproximadamente metade das infecções por *Candida* spp. não sejam detectadas, este continua a ser o método de eleição para confirmação de infecções fungicas a nível microbiológico (Guinea, 2014; Oren e Paul, 2014; Ruhnke, 2014).

A automatização das hemoculturas permitiu reduzir o tempo despendido no diagnóstico de micoses invasivas, de que são exemplo as candidoses e em que a detecção do patógeno no sangue é relativamente comum (Quindós et al., 2012).

Para a colonização ser clinicamente significativa deve ser multifocal, sendo detectada *Candida* spp. em várias amostras de locais distintos. No caso de uma cultura positiva de *Candida* spp. obtida de um local não estéril esta não reflecte a doença mas reflecte muito provavelmente a colonização, sendo que esta detecção não representa uma infecção invasiva, não deve levar à administração de tratamento sistémico (Ruhnke, 2014).

O painel de *European Fungal Infection Study Group /European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (EFISG/ESCMID) apresenta a microscopia directa e a histopatologia como passos essenciais no diagnóstico de candidoses invasivas e recomenda a sua realização sempre que possível (Tabela 5), pois apesar de, como já referido provocarem atrasos no diagnóstico, estas técnicas são pouco dispendiosas e disponibilizam informação preciosa permitindo a realização de testes de sensibilidade a AF,

que se têm revelado essenciais devido à alteração nos padrões de resistência (Low e Rotstein, 2011; Sampaio e Pais, 2014).

Tabela 5: Resumo de recomendações do painel EFISG/ESCMID e nível de evidência para os testes de diagnóstico utilizados em candidoses. Adaptado de: (Sampaio e Pais, 2014)

| Espécie | Teste | Recomendação | Nível de evidência | Especificidades para a detecção de <i>C. glabrata</i> |
|---------|--------------------------------------|------------------------------------|--------------------|--|
| Sangue | Hemocultura | Essencialmente para investigação | NA | BacT/ALERT system é preferível para isolamento de <i>C. glabrata</i> |
| Tecidos | Microscopia directa e histopatologia | Essencialmente para investigação | NA | <i>C. glabrata</i> não forma filamentos |
| | Cultura | Essencialmente para investigação | NA | -- |
| | Imuno-histoquímica | Sem recomendações | Sem dados | -- |
| | PCR de tecidos | Sem recomendações | Sem dados | -- |
| Soro | Manano/anti-Manano | Sem recomendações | Sem dados | -- |
| | | Recomendado apenas para candidémia | II | |
| | B-1,3-D-glicano | Recomendado | II | Pré-tratamento com equinocandinas reduz precisão |
| | Setptifast system | Sem recomendações | Sem dados | -- |
| | In-house PCR | Sem recomendações | Sem dados | -- |

PCR *polymerase chain reaction*; NA não aplicável; II indica evidência de pelo menos um estudo prospectivo ou estudo cohort, ou estudo retrospectivo multicentrado ou estudos de caso-controlo; -- indica ausência de especificidade;

Os critérios da *European Organization for Research and Treatment of Cancer/Infectious Diseases Mycoses Study Group* (EORTC/MSG) permitem assim, apesar de apenas parcialmente, a padronização do diagnóstico de IFI (Low e Rotstein, 2011). De modo a solucionar este problema foram desenvolvidas técnicas serológicas e moleculares não baseadas no exame cultural de amostras ou microrganismos, reduzindo de forma significativa o tempo necessário para a identificação do patógeno (Quindós et al., 2012).

É de extrema importância a utilização de técnicas que abranjam o diagnóstico de diversas espécies, uma vez que a epidemiologia fúngica tem vindo a alterar-se por completo, sendo

exemplo disso a preocupação crescente com infecções por espécies não *albicans*, em detrimento daquelas por *C. albicans* (Lass-Flörl et al., 2013).

Métodos de diagnóstico Imunobioquímico e Molecular

Os métodos moleculares incluem a detecção de marcadores biológicos em amostras obtidas através de colheitas não invasivas, sendo utilizados no controlo do risco de infecção em doentes nas UCIs para melhorar e antecipar a detecção de candidoses. Estes baseiam-se na detecção e quantificação de biomarcadores e componentes fúngicos como β -1,3-D-glicano (BDG) no soro dos pacientes ou na detecção de anticorpos (Ac) antimanano (Mn), sendo o manano um polissacarídeo presente na parede celular com capacidade de estimular o sistema imunitário (Sampaio e Pais, 2014). As vantagens e desvantagens destes métodos são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Potenciais vantagens e desvantagens de métodos de cultura não baseados em culturas. Adaptado de (Clancy e Nguyen, 2013).

| Potenciais vantagens | Potenciais desvantagens |
|--|---|
| Resultados rápidos | Não recuperarem organismos |
| Independentes de organismos viáveis | Podem não ser específicos para <i>Candida</i> spp. ou não conseguirem distinguir espécies |
| Positivos antes das culturas e manterem-se positivos durante a terapêutica AF | Espectro estreito |
| Fornecer dados quantitativos com relevância para o prognóstico | Podem ter que ser efectuados em lotes em laboratórios micológicos clínicos devido a número reduzido de amostras |
| Alvos múltiplos e amplificação podem melhorar a sensibilidade | Podem ter baixo limiar de contaminação |
| Podem ser efectuados em conjunto com marcadores de resistência a fármacos ou outros fenótipos relevantes | Custo para os pacientes e para o laboratório de microbiologia clínica. |

Detecção de Antígenos (Ag) e Anticorpos (Ac)

Este teste é realizado normalmente no soro do paciente, tendo apresentado também bons resultados utilizando líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite (Ostrosky-Zeichner e Pappas, 2006).

Actualmente estão disponíveis diversos testes comerciais baseados em Ac, sendo o mais relevante *Platelia Candida Acs* (Bio-rad Laboratories, Portugal), pesquisa Acs antimanano que se desenvolvem em pacientes após desaparecimento de mananos originários de um episódio de candidémia. A sensibilidade deste teste foi avaliada em 59% com uma especificidade global de 83% (Tabela 7) (Ostrosky-Zeichner, 2012).

Testes imunoenzimáticos (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* -ELISA) e de aglutinação em látex estão comercialmente disponíveis para detecção de Mn, sendo que os resultados mais relevantes são contudo obtidos aquando da utilização conjunta de ensaios de Ag/Ac antimanano (*Platelia Bio-Rad*) (Tabela 7). A detecção de Ac e Ag é utilizada com sucesso em pacientes com neutropénia apesar da preocupação da influência da imunossupressão na obtenção de resultados. Dados recolhidos em 14 meta-análises demonstraram que a sensibilidade e especificidade aumentavam aquando da utilização do teste combinado, apresentando valores de 83% e 86% respectivamente, apresentando maior aplicabilidade em infecções causadas por *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (Clancy e Nguyen, 2013; León, Ostrosky-Zeichner, e Schuster, 2014).

Tabela 7: Desempenho dos testes comerciais de detecção de Ag e Ac, disponíveis para diagnóstico de IC. Adaptado de (Khan e Ahmad, 2012).

| Teste Comercial | Ag ou Ac Detectado | %* Sensibilidade | %* Especificidade |
|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Fungitell | 1,3-β-D glicano | 77 | 85 |
| <i>Platelia Candida Ag</i> | Manano | 58 | 93 |
| <i>Platelia Candida Ac</i> | Acs anti manano | 59 | 83 |
| <i>Platelia Candida Ag+Ac</i> | Manano + Acs anti manano | 83 | 86 |

*valores cumulativos de sensibilidade e especificidade baseados em vários estudos publicados.

O BDG é um componente da parede celular da maioria dos fungos, incluído *C. glabrata*. Este marcador serológico foi incluído nos critérios de diagnóstico EORTC/MSG, e vários testes de detecção têm sido baseados neste componente para o diagnóstico de candidoses. Estes têm focado em particular candidoses associadas ao desenvolvimento de biofilmes em cateteres, uma vez que estas películas produzidas por *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* libertam quantidades importantes de BDG (Espinosa e Microbiología, 2010).

A medição de BDG no soro apresenta elevada precisão no diagnóstico de IFI de acordo com os critérios EORTC/MSG, sendo a sua sensibilidade menor que a especificidade (77% para 85%, respectivamente). Porém o teste não é específico para candidoses uma vez que detecta BDG proveniente de qualquer fungo que infecte o paciente (Karageorgopoulos et al., 2011). Existem por isso algumas reservas no que diz respeito à especificidade e falsos positivos. Os falsos positivos são raros em controlos mas comuns em doentes com infecções por bactérias Gram positivas e Gram negativas (Clancy e Nguyen, 2013). Assim os valores analisados por este teste podem estar aumentados por outra razão que não a presença de infecção fúngica, limitando a sua utilização (Karageorgopoulos et al., 2011).

Apesar de este teste ter sido aprovado nalguns locais não foi ainda aceite globalmente devido a dificuldades na sua utilização a nível técnico, sendo necessário pessoal especializado para a sua realização e todos os passos a realizar tem a duração de pelo menos 1h (Karageorgopoulos et al., 2011; Low e Rotstein, 2011).

Os métodos serológicos apresentam como principal limitação a impossibilidade de distinção entre infecção e colonização (Sampaio e Pais, 2014). Não obstante, a maior confiança nestes novos testes permite realizar menos biópsias e obter menos amostras histológicas normalmente utilizadas para confirmar candidoses invasivas (Low e Rotstein, 2011).

Métodos de diagnóstico molecular

A reacção de polimerase em cadeia (PCR) tem vindo a ser utilizada para auxiliar o diagnóstico de infecções fúngicas. Como expõe, Lass-Flörl et al., 2013, “Ao longo das duas últimas décadas, as técnicas moleculares têm sido implementadas para aumentar a eficácia na identificação do patógeno”.

A utilização de PCR para detectar infecções fúngicas sistémicas tem sido muito investigada e apresenta bons resultados no que diz respeito à sensibilidade e especificidade e preenche muitos dos requisitos apresentados na Tabela 8. Uma meta-análise recente demonstrou que a sensibilidade e especificidade da PCR no diagnóstico de suspeita de candidose invasiva atingem os 95% e 92% respectivamente, e no caso de candidose invasiva provável apresenta valores de 85% e 38%. Estudos comparativos de técnicas baseadas em PCR com

ensaios serológicos demonstraram que os resultados positivos por PCR são 2-4 dias mais rápidos do que os obtidos por ELISA (Clancy e Nguyen, 2013; Sampaio e Pais, 2014).

Existem disponíveis no mercado diferentes formatos de sistemas de PCR para a detecção qualitativa e/ou quantitativa de ADN específico de *Candida* spp., sendo que as técnicas utilizadas incluem o semi-nested PCR, PCR com detecção por imunoensaio, PCR em tempo real com diferentes variações, PCR multiplex, seguido por sequenciação de ADN ou pirosequenciamento (Ahmad, Khan, Mustafa, e Khan, 2002; Badali e Nabili, 2012).

A técnica PCR em tempo real permite a detecção de algumas espécies importantes de *Candida*. A detecção de ADN por PCR em tempo real é provavelmente o maior avanço neste campo nos últimos anos, já que embora uma hemocultura positiva para *Candida* seja uma prova irrefutável para o diagnóstico de candidose, um resultado positivo de PCR em pacientes com factores de risco para o seu desenvolvimento apesar de hemocultura negativa pode, de acordo com alguns autores, ser evidência suficiente para início rápido de tratamento empírico. Apesar do desenvolvimentos de técnicas com resultados animadores no campo do diagnóstico de candidoses, o facto de cada laboratório utilizar testes que eles mesmos desenvolvem dificulta a padronização e a comparação directa entre os diferentes estudos efectuados (Espinosa e Microbiología, 2010).

Actualmente existem disponíveis comercialmente vários procedimentos como *SeptiFast* (Roche, Alemanha), *SepsiTest* (Molzym GmbH e Co. KG, Bremen, Alemanha), *VYOO* (SIRS-Lab GmbH, Jena, Alemanha), e o sistema *microarray-based*® (*Mobidiag*, Finlândia). Estes ensaios detectam infecções na corrente sanguínea causadas por vários patógenos sendo por isso aplicáveis à detecção de *C. glabrata* (Choi et al., 2013). O primeiro método de PCR em tempo real disponível no mercado (*SeptiFast- Roche*) foi projectado para detectar mais de 25 isolados microbianos patogénicos, incluindo 5 espécies de *Candida*. Este teste é realizado através da análise de uma amostra de sangue colhida em simultâneo para hemocultura, sendo que a extracção de ADN humano e patógeno envolve lise mecânica e colunas de rotação manual sob um fluxo de trabalho controlado de contaminação. O ADN é extraído e amplificado em três ensaios de PCR em tempo real separados, para bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos. Os produtos de

amplificação sofrem hibridação com sondas fluorescentes em tempo real. O teste é concluído em aproximadamente 6 h (Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoefft A, 2008).

Tem também sido descrita a utilização de PCR panfúngico seguido de sequenciação de regiões específicas de espécie ou de hibridação de sonda com iniciadores específicos sobre um microarray (Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoefft A, 2008).

A técnica de *Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridation* (PNA FISH) permite a identificação precoce das espécies mais relevantes de *Candida* observadas em colorações de hemoculturas. Os polímeros sintetizados artificialmente similares ao ADN e o ARN (PNAs), são formados a partir de uma estrutura artificial de poliamida resistente à degradação pelas nucleases e proteases que formam complexos estáveis com o ADN e ARN complementar. Os PNA são marcados com uma molécula fluorescente que permite a sua identificação em apenas 2,5h (Canton, García-rodríguez, Martín-mazuelos, e Pemán, 2014; “PNA Peptide Nucleic Acid,” n.d.).

A detecção de ADN fúngico não é um critério de diagnóstico de IFI aceite pela EORTC, pelo que a avaliação dos resultados deve ser interpretada com atenção. Embora a técnica PNA FISH não melhore a sensibilidade de uma hemocultura, pelo menos antecipa a identificação de candidoses, e o seu uso tem diminuído a utilização de AF (Canton et al., 2014).

A região ITS1-5,8S-ITS2 é considerada o código de barras dos fungos, uma vez que permite a identificação precisa de leveduras. A caracterização molecular permite avaliar a diferença genética entre as estirpes da mesma espécie. Esta pode ser efectuada por diferentes sistemas, os microssatélites estão a despertar grande interesse nos últimos anos, pela sua capacidade discriminatória, reprodutibilidade e pela possibilidade de enviar os resultados para outros laboratórios (Canton et al., 2014).

A identificação de *C. glabrata* pode ser efectuada pela amplificação de ácidos nucleicos fúngicos através dos isolados clínicos ou a identificação por espectrometria de massas (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight* - MALDI-TOF) está cada vez mais acessível, apresentando como vantagens a sua rapidez e custos (Canton et al., 2014).

Devido as estas técnicas tem sido possível avançar consideravelmente no conhecimento dos mecanismos de resistência a AF. A espectrometria de massas baseada na ionização e dessorção através de uma matriz por laser e espectrometria com tempo de retorno está a ser aplicada à micologia (Canton et al., 2014).

As identificações obtidas por espectrometria de massa têm o mesmo grau de fiabilidade que as técnicas de biologia molecular, contudo convém ter precaução quando a identificação obtida não é a esperada. Devem efectuar-se estes testes com alguma prudência quando se sabe, através da literatura ou por experiência do próprio laboratório, que os resultados obtidos podem ser pouco fiáveis (Canton et al., 2014).

Tabela 8: Metodologias microbiológicas utilizadas no diagnóstico de IC em UCIs e as suas vantagens e desvantagens. Adaptado de (Javier Pemán, 2010).

| Técnica | SEN (%) | ESP (%) | Vantagens | Desvantagens |
|---|----------------|----------------|---|--|
| 1,3-β-D glicano | 70-100 | 87-96 | Marcador panfúngico, elevada SEN e VPP, útil no soro e em outras amostras clínicas | Experiência limitada, falsos positivos, problemas de metodologia |
| ADN fúngico | 90 | 100 | Elevada ESP, útil no soro e em outras amostras clínicas | Poucos métodos padronizados e validados comercialmente |
| Acs anti tubo germinativo de <i>C. albicans</i> | 77-89 | 91-100 | Utilizado no diagnóstico e monitorização do tratamento, elevada ESP, detecta várias espécies de <i>Candida</i> | Experiência limitada |
| Manano e Acs anti manano | 60-89 | 80-84 | Boa ESP e SEN quando em uso combinado | Experiência limitada |
| Combinação de metodologias não culturais | 87 | 100 | Elevada ESP, SEN e VPP, útil para diagnóstico e monitorização | Custos elevados |
| Cultura | 50 | 100 | Técnica de eleição, útil no sangue e em outras amostras clínicas, permite a realização de testes de susceptibilidade antifúngica. | Baixa SEN, demorada |

SEN- sensibilidade, ESP-especificidade, VPP- valor preditivo positivo.

Os métodos moleculares apresentam como vantagem além da apresentação de um resultado positivo, possibilitarem a identificação da espécie de fungo responsável pela infecção. As técnicas moleculares têm apresentado resultados prometedores apesar de ainda não ter sido

possível a sua afirmação nos laboratórios devido aos seus elevados custos, necessidade de pessoal qualificado e à falta de padronização, que no caso da técnica de PCR se refere ao tipo de amostra clínica, selecção do *primer* e formato da técnica de PCR (qualitativa vs. quantitativa, em tempo real) (Canton et al., 2014; Oren e Paul, 2014).

Como não é possível obter com certeza a identidade do fungo pelos métodos mais utilizados estão a ser desenvolvidos métodos de imuno-histoquímica, hibridação *in situ* ou amplificação de ácidos nucleicos em amostras de tecido que representam uma combinação eficaz entre métodos convencionais e moleculares (Quindós et al., 2012).

São por isso estudadas, hoje em dia, diversas combinações entre os diferentes tipos de métodos de diagnóstico de modo a optimizá-lo (Tabela 8). Apesar da confiança depositada nos testes baseados em PCR, estes ainda não se encontram prontos para serem introduzidos no diagnóstico laboratorial de rotina, sendo que as incertezas e complexidade a eles associadas devem ser resolvidas antes da sua utilização generalizada. (Clancy e Nguyen, 2013).

Tratamento

No caso de doentes internados em UCIs quando se isola *C. glabrata* não existe modo de discernir se se trata de um episódio autolimitado e transitório ou se evoluirá para uma infecção sistémica e, consequentemente mais complicada caracterizada por endocardites, osteomielites ou endoftalmítes (Garnacho-Montero et al., 2012).

Em pacientes em estado crítico esta espécie é isolada com elevada frequência em locais não estéreis, sendo que a colonização em múltiplos locais afecta aproximadamente 50% dos pacientes. Sensivelmente 90-95% dos pacientes em estado crítico admitidos nas UCIs são adultos não neutropénicos, e as infecções por *Candida* representam 17% de todas as infecções adquiridas nestas unidades. A colonização por este género é detectada em aproximadamente 60% dos doentes não neutropénicos que se encontram internados por mais de uma semana. Deve ter-se em conta que apesar de uma elevada percentagem de colonização por *C. glabrata*, apenas 5-30% irão desenvolver candidose invasiva (Garnacho-Montero et al., 2012; León et al., 2014).

Por outro lado, quando *C. glabrata* é isolada em produtos biológicos estéreis, como a hemocultura, nunca deve ser considerada contaminação e deve dar sempre origem a tratamento imediato (Garnacho-Montero et al., 2012).

O elevado número de complicações associado a infecções invasivas por *C. glabrata* levou a um uso excessivo de AF na terapêutica e em profilaxia (Ruhnke, 2014). Surge portanto, associada ao tratamento urgente destas infecções, a administração inadequada de AF, que dá origem a outro problema: o das resistências. Sabe-se por, Garnacho-Montero et al., 2012, que a “identificação de infecções por *C. glabrata* representa um factor de risco acrescido para administração inadequada de tratamento empírico em pacientes críticos com septicemia”. Esta situação faz com que na prática clínica diária o tratamento AF seja nalguns casos protelado, permitindo a obtenção de resultados de testes que confirmem candidose, o que pode, em parte, contribuir para a elevada taxa de mortalidade (Garnacho-Montero et al., 2012).

Tipos de tratamento

Ao utilizar a profilaxia como estratégia de tratamento corre-se o risco de aumentar o número de infecções por estirpes resistentes (Oren e Paul, 2014). É por isso essencial que a sua implementação seja ponderada (Figura 8).

Os clínicos devem, no momento de avaliarem a necessidade de profilaxia com fluconazol, ter em conta o potencial para resistências e emergência de espécies não *albicans*, como *C. glabrata* (Ruhnke, 2014). Segundo, Clancy e Nguyen, 2013, a administração de terapêutica antifúngica profilática a todos os internados numa UCI beneficiaria apenas 1 em cada 33 pacientes.

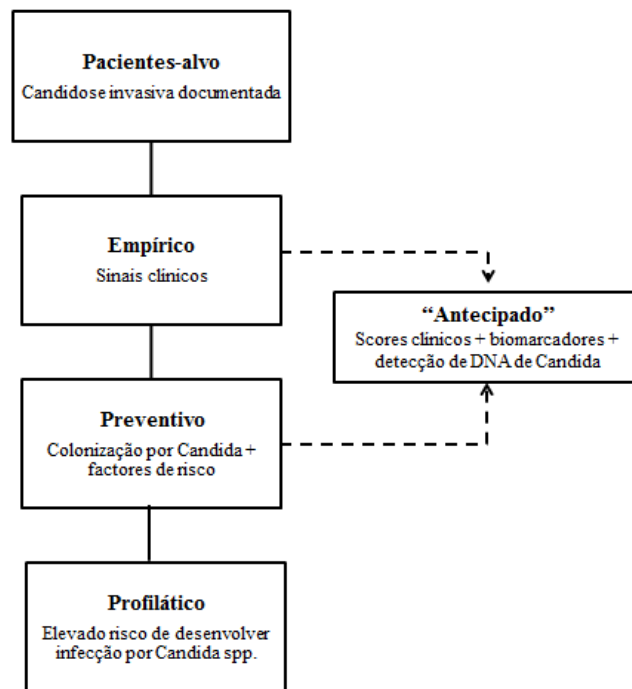


Figura 8: Tratamento AF proposto para pacientes em estado crítico com candidose invasiva. Adaptado de (León et al., 2014).

A estratificação dos pacientes pode ajudar os clínicos na selecção do AF mais adequado e a determinar a administração de terapêutica “antecipada”. Para isto há que definir o conceito de candidose invasiva documentada (candidose primária ou infecção clinicamente comprovada) e infecção provável por *C. glabrata*, baseada na presença de factores de risco já referidos anteriormente como internamento prolongado em UCIs, colonização de elevado

grau, septicemia e resultados positivos de biomarcadores específicos para infecção por *C. glabrata* (León et al., 2014).

Nas UCIs, o tratamento empírico de suspeita de infecção por *C. glabrata* é comum na prática clínica e suportado por directrizes da ISDA para o controlo de candidoses. Contudo, a terapêutica AF empírica para tratamento de suspeita de infecção invasiva por *C. glabrata* nas UCIs, pode levar ao uso excessivo de AF e não deve ser considerada como *standard* a menos que, métodos de diagnóstico indiquem a presença de doença invasiva. O tratamento empírico com fluconazol não deve ser a primeira opção quando estamos na presença de um doente em estado crítico (por exemplo com sinais de sepsis), deve optar-se pela administração de uma equinocandina ou anfotericina B (AmB) lipídica. O tratamento antifúngico para candidoses não complicadas tem a duração recomendada de 14 dias após a primeira hemocultura negativa em conjunto com a cessação de todos os sintomas (Ruhnke, 2014). Se possível e adequado para a situação específica, o clínico deve alterar para terapêutica oral após 10 dias de terapêutica intravenosa, uma vez que se tem verificado seguro para doentes com patogénios susceptíveis ao tratamento administrado. Esta alteração deve ser efectuada tendo em conta a capacidade de absorção gastrointestinal do paciente (Cornely et al., 2012). Nos dias de hoje os médicos responsáveis por doentes imunocomprometidos têm tendência a utilizar de forma excessiva os AF. Estes têm como preocupação imediata o doente em estado crítico e tendem a iniciar terapêutica antifúngica empírica quando a terapêutica com ATB falha. É também verdade que se a terapêutica com AF não for iniciada dentro de 24h, após o diagnóstico de choque séptico por *C. glabrata*, a taxa de fatalidade atinge aproximadamente os 100% (Ruhnke, 2014). O seguinte esquema reflecte alguns parâmetros importantes que os médicos devem considerar para o tratamento de doentes não-neutropénicos em estado crítico (Figura 9).

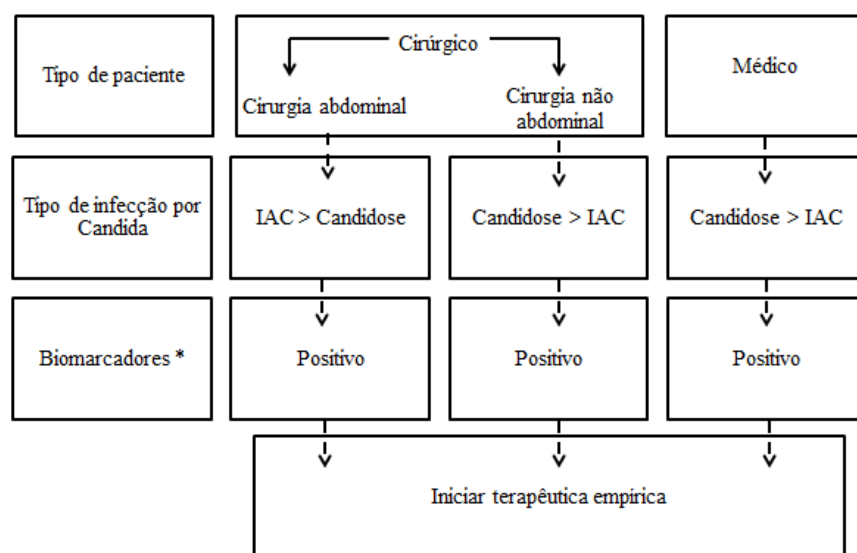


Figura 9: Abordagem para a escolha do tratamento para doentes não neutropênicos adultos em estado crítico com provável infecção por *Candida* spp.. *(1,3- β -D-glicano ou outro biomarcador sozinho ou em conjunto, duas amostras consecutivas). IAC candidose intra-abdominal. Adaptado de (León et al., 2014).

Actualmente, aproximadamente 70% da terapêutica antifúngica nas UCIs corresponde a terapêutica profilática ou pré-emptiva (León et al., 2014). A utilização de AF como tratamento profilático tem demonstrado uma redução da mortalidade em pacientes hemato-oncológicos de alto risco e cada unidade hospitalar deve definir os respectivos protocolos de profilaxia com base na epidemiologia local e incidência de infecções por *C. glabrata* (Oren e Paul, 2014).

Alguns grupos de pacientes podem obter benefícios pela utilização deste uso profilático, contudo, até hoje a população-alvo para este procedimento permanece por esclarecer. Actualmente apenas pacientes que tenham sido submetidos a cirurgia abdominal ou com perfurações gastrointestinais, devem ser considerados elegíveis para profilaxia com fluconazol, não devendo ser aplicado a outros doentes (Ruhnke, 2014).

Além da profilaxia, que não é mais que uma forma de prevenção da infecção antes de esta estar instalada, com eventuais consequências graves como pudemos analisar anteriormente, podemos ainda considerar o tratamento pré-emptivo e empírico. Há que, em primeiro lugar, realçar a principal diferença entre estes dois tipos de tratamento. Ambos se traduzem na utilização de um AF num paciente neutropénico com febre persistente apesar da

administração de ATB, sendo que no tratamento empírico não existe evidência de IFI. A duração do tratamento pré-emptivo tende a ser mais longa, uma vez que o nível de certeza da existência de uma infecção fúngica é maior (Merck, 2014).

O fundamento para o tratamento pré-emptivo passa pela diminuição da toxicidade e custo da terapêutica e prevenção do desenvolvimento de resistências quando comparado com o tratamento empírico, uma vez que é mais dirigido. Contudo, nos dias de hoje, o desenvolvimento de técnicas serológicas e de imagiologia permitem uma detecção rápida de IFI e a estratégia pré-emptiva tornou-se opcional (Oren e Paul, 2014).

É recomendada a realização de hemoculturas antes e após o início da terapêutica AF, ou de acordo com as normas da *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) que sugerem a sua realização diária até resultado negativo (Ruhnke, 2014).

Mecanismos de acção/grupos de antifúngicos

Os AF utilizados para o tratamento de infecções por *C. glabrata* apresentam diferentes mecanismos de acção, pelo que é possível dividi-los em grupos de acordo com o seu mecanismo. Os principais fármacos AF utilizados no tratamento de infecções por esta espécie dividem-se em três famílias diferentes como podemos observar na Tabela 9.

Tabela 9: Principais grupos de AF utilizados no tratamento de infecções fúngicas. Adaptado de (Perfect, 2010).

| <i>Mecanismo de acção</i> | <i>AF</i> |
|--|-----------------|
| Acção na membrana celular | Polienos |
| | Azóis |
| Outros com acção na síntese de ergosterol | Alilaminas |
| Acção na parede celular | Equinocandinas |
| | Antimetabolitos |

Uma das classes de AF que actuam sobre a membrana celular são os polienos, estes ligam-se principalmente ao ergosterol das membranas celulares dos fungos e mamíferos, originando poros ou canais que permitem a passagem de pequenas moléculas. A este grupo pertencem a AmB nas suas formulações lipídica, coloidal e lipossomal que permitiram, em relação à AmB, aumentar a dose deste fármaco com menor incidência de efeitos adversos relacionados à sua infusão (calafrios, febre, náuseas, vômitos e dor de cabeça). Além destes tem sido difícil o desenvolvimento de outros polienos para administração sistémica por apresentarem elevada toxicidade e menor eficácia (Perfect, 2010). Durante um longo período de tempo a AmB desoxicolato foi a única opção no tratamento de candidoses invasivas, todavia esta apresenta graves efeitos adversos como nefrotoxicidade o que restringe a sua utilização prolongada (Espinosa e Microbiología, 2010; Tscherner et al., 2011). A sua administração apenas por via injectável limita também a sua utilização (Perfect, 2010).

Com o aumento de infecções por *Candida*, aumentaram também o número de AF, sendo que em 1981 passou a estar disponível aquele que viria a ser o primeiro AF pertencente ao grupo dos Azóis, o cetoconazol (Espinosa e Microbiología, 2010).

Os Azóis à semelhança do grupo anterior apresentam igualmente acção sobre o ergosterol inibindo a α -demetilase, provocando acumulação do seu substrato com consequente inibição do crescimento celular. Este grupo apresenta propriedades químicas distintas, o que resulta em diferentes farmacocinéticas e consequentemente diferentes espectros de acção entre os seus membros: cetoconazol, itraconazol, fluconazol e os pertencentes à nova geração: voriconazol (aprovado pela FDA em 2002) e posaconazol (aprovado em 2006) (Perfect, 2010).

O fluconazol revolucionou o tratamento de candidíases devido à sua acção contra *C. albicans* e a sua excelente tolerabilidade. Este é ainda hoje a primeira linha no tratamento e profilaxia de infecções por *Candida* (Espinosa e Microbiología, 2010).

Na Tabela 10 podemos observar os fármacos distribuídos por classes, a via de administração disponível e a sua dose habitual para o tratamento de candidoses.

Tabela 10: Antifúngicos utilizados no tratamento de candidoses. Adaptado de (Espinosa e Microbiologia, 2010).

| Classe | Mecanismo de acção | Fármaco | Via de administração | Dose habitual |
|----------------|--|--|----------------------|--|
| Polienos | Ligação ao ergosterol da membrana do fungo, altera a sua permeabilidade. | Anfotericina B deoxicolato Anfotericina B complexo lipídico Anfotericina B dispersão coloidal Anfotericina lipossomal | Intravenosa | 0.6-1.0 mg/Kg/dia 3-5 mg/Kg/dia 3-4 mg/Kg/dia 3-5 mg/Kg/dia |
| Azóis | Inibem a síntese do ergosterol | Fluconazol Voriconazol | Intravenosa/oral | 400-600 mg/dia 6 mg/Kg/12h, após 4 mg/Kg/12h |
| Equinocandinas | Inibem a síntese do β -D-glicano | Caspofungina Micafungina Anidulafungina | Intravenosa | 70 mg (dose de carga) Depois 50 mg/dia |

Outras estruturas celulares podem ser alvo dos agentes AF, sendo uma destas a parede celular. O maior obstáculo inerente a esta estratégia são as consideráveis diferenças entre as paredes celulares das diferentes espécies fúngicas, o que pode justificar a variabilidade de *C. glabrata* na resposta a fármacos (Perfect, 2010).

As equinocandinas caspofungina, micafungina e anidulafungina actuam na 1,3- β -D-glicano sintetase afectando a estabilidade da parede celular. O 1,3- β -D-glicano (BDG) é o componente primário desta estrutura em *C. glabrata* e também em *Aspergillus* spp. o que os torna competentes para o tratamento de aspergiloses e candidoses invasivas (Perfect, 2010). Estas são a classe preferencial de AF no tratamento de candidoses por *C. glabrata*, contudo resultados recentes sugerem um aumento no número de isolados desta espécie que demonstram resistência não só aos Azóis mas também a estes AF (Miyazaki e Kohno, 2014).

Segundo, Perfect, 2010, no tratamento de candidoses invasivas a flucitosina é associada à AmB com resultados geralmente positivos e melhoria em peritonites quando comparada com o uso de fluconazol.

Escolha do antifúngico

Quando se trata de implementar o tratamento de IFI por *C. glabrata* temos que avaliar a condição clínica do doente. Neste caso é importante a distinção entre doentes neutropénicos (com baixa contagem de neutrófilos) e doentes não neutropénicos.

Em 2009 a *Infectious Diseases Society of America* (ISDA) reviu as normas apresentadas em 2004 de modo a actualizar a lista com novos AF desenvolvidos e adaptar os procedimentos à nova realidade (Pappas et al., 2009), como se pode analisar na Tabela 11.

A recomendação primária para o tratamento de pacientes não neutropénicos é a administração de fluconazol ou uma equinocandina, sendo o tratamento alternativo a administração da formulação lipídica de AmB, AmB deoxicolato ou voriconazol. A recomendação para administração de equinocandinas foi ampliada a pacientes com doença moderadamente grave a grave ou com exposição recente a Azóis (Póvoa e Gonçalves-Pereira, 2011).

Tabela 11: Directrizes da ISDA para o tratamento de candidose em pacientes adultos não neutropénicos. Adaptado de (Póvoa e Gonçalves-Pereira, 2011).

| | 2004 | 2009 |
|-------------------------|---|---|
| Terapêutica recomendada | AmB-d 0.6 a 1 mg/Kg/dia Fluconazol 400 a 800 mg/dia Caspofungina 50 mg/dia (70 mg na 1ª dose) | Equinocandinas: Caspofungina 50 mg/dia (70 mg na 1ª dose) |
| Terapêutica alternativa | AmB-d 0.7 mg/kg/dia + Fluconazol 800 mg/dia (4 a 7 dias, depois Fluconazol 800 mg/dia) | LsF-AmB 3 a 5 mg/kg/dia AmB-d 0.5 a 1 mg/kg Voriconazol 3 mg/kg bid (6 mg/kg nas primeiras duas doses). |
| Duração da terapêutica | Pelo menos 14 dias depois da hemocultura positiva | Pelo menos 14 dias depois da última hemocultura positiva |
| Outras recomendações | Remover cateter venoso central Avaliação oftalmológica | Remover cateter venoso central Avaliação oftalmológica |

Aquando do isolamento de *C. glabrata* em secreções respiratórias, deve considerar-se que este pode não ser sinónimo de uma infecção invasiva pelo que, como noutras situações em que a patologia não está confirmada, não deve dar origem a tratamento precipitado com nenhum dos diferentes AF (Ullmann et al., 2012).

Um estudo recente sugere que a anidulafungina poderá ser superior ao fluconazol como terapêutica primária para candidose em pacientes não neutropénicos, contudo as condições do estudo não permitem tirar conclusões, sendo necessários estudos posteriores mais aprofundados sobre este assunto. Na melhor das hipóteses o estudo mostrou que a anidulafungina não era inferior ao fluconazol (Póvoa e Gonçalves-Pereira, 2011).

A análise aos estudos realizados nesta área deve ser cuidadosa uma vez que, a maioria publicada até à data, indica eficácia similar entre preparações de AmB, fluconazol e equinocandinas, sendo que a escolha para terapêutica de primeira linha deve ter em conta os factores de risco individuais, padrão de sensibilidade de *C. glabrata*, experiência clínica, bem como a disponibilidade e custo dos fármacos (Póvoa e Gonçalves-Pereira, 2011). A tabela seguinte resume a terapêutica de primeira e segunda linha para doentes neutropénicos e não neutropénicos (Tabela 12).

Tabela 12: Terapêutica farmacológica contra infecções fúngicas causadas por *Candida* em pacientes imunocomprometidos. Adaptado de (Low e Rotstein, 2011).

| Patógeno | Condição do doente | Terapêutica | | Comentários |
|---------------------|---------------------------------------|------------------------------|---|--|
| | | 1ª linha | 2ª linha | |
| <i>Candida</i> spp. | Adulto não-neutropénico com candidose | Fluconazol Equinocandinas | Voriconazol Anfotericina B desoxicolato Anfotericina B lipossomal | Utilizar Equinocandinas para doença moderada a severa e em pacientes com recente exposição ao Fluconazol (nos últimos 30 dias); transição para fluconazol após início com equinocandinas é possível em muitos casos; remover se possível todos os cateteres intravasculares; tratar 14 dias após primeira análise sanguínea negativa e estabelecimento dos sinais e sintomas de candidose. |

| | | | | |
|--|---|--|---------------------------|--|
| | Adulto neutropénico com candidose | Equinocandinas Anfotericina B lipossomal | Fluconazol Voriconazol | Equinocandinas ou Anfotericina B lipossomal são preferíveis para quase todos os pacientes; fluconazol para pacientes sem exposição prévia e que não se encontrem em estado crítico (neutropénia ≤ 7 dias); voriconazol é recomendado quando é necessário espectro contra bolores. |
|--|---|--|---------------------------|--|

A escolha de AF é influenciada por vários factores entre os quais espectro de acção, perfil farmacocinético, disponibilidade via intravenosa (IV)/oral, interacções e preocupação com o desenvolvimento de resistências (Perfect, 2010). Esta deve também considerar a disponibilidade de cada fármaco em diferentes formas farmacêuticas. Meta-análises recentes concluíram que o fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, AmB lipossomal e micafungina têm potencial para diminuir a percentagem de IFI quando comparados com a ausência de tratamento. O posaconazol e voriconazol têm demonstrado maior efectividade que a fórmula oral em cápsulas de fluconazol e voriconazol. A suspensão oral de itraconazol apresenta maior biodisponibilidade que as cápsulas, contudo apresenta baixa tolerabilidade o que impede o seu uso em grande escala (Oren e Paul, 2014).

A escolha do AF deve ainda ser baseada em dados sobre as resistências de *C. glabrata* fornecidos por estudos observacionais. Estes têm demonstrado que a maioria das estirpes são sensíveis à AmB e caspofungina e resistentes ao itraconazol, dados confirmados por, Golaś et al., 2014.

No que diz respeito à AmB, esta permanece como o AF com a mais rápida taxa de mortalidade, efeito pós-antifúngico mais prolongado e a sua eficácia aumenta com a concentração. Embora a formulação lipídica desta apresente maior segurança na sua administração, o custo associado representa o maior entrave à sua utilização rotineira (Póvoa e Gonçalves-Pereira, 2011).

AF mais recentes são, não só mais seguros para o tratamento de infecções por *C. glabrata*, como têm igual ou superior eficácia e são mais práticos de administrar. Infelizmente, a maioria destes são mais dispendiosos e os médicos são confrontados com regulamentos administrativos dos hospitais de modo a evitar o seu uso para não aumentar, ainda mais, o

sobrecarregado orçamento destinado à saúde (Ruhnke, 2014). A utilização de posaconazol a nível global era travada, até há pouco tempo, pela inexistência de formulação I.V. para administração a pacientes impossibilitados de utilizar a via oral, sendo que no decorrer deste ano, a *Food and Drug Administration* (FDA) desenvolveu e aprovou a sua utilização em doentes acima dos 18 anos, sendo esta forma farmacêutica particularmente importante para profilaxia em pacientes de alto risco (imunocomprometidos com neutropénia prolongada) com infecções invasivas por *C. glabrata* e outras espécies de *Candida* (A. Lees, n.d.). Outros entraves à utilização deste AF são os custos, a preocupação em relação à indução de resistências e a falta de alternativas aquando do surgimento de novos patogénios, uma vez que o leque de AF disponível não é muito vasto (Oren e Paul, 2014).

O posaconazol e o itraconazol têm sido associados ao aparecimento de estirpes de *C. glabrata* com baixa susceptibilidade aos Azóis e a utilização de fluconazol parece causar o aparecimento de infecções por *C. glabrata* e *C. krusei* (Oren e Paul, 2014).

Para o tratamento de infecções da corrente sanguínea por *C. glabrata* vários dos AF, referidos anteriormente, são efectivos e bem tolerados. Por isso o uso de terapêutica combinada apenas deve ser considerada para formas de candidose particularmente difíceis de tratar. Como já referido a associação de flucitosina/AmB é possível e é utilizada em candidoses do sistema nervoso central ou em casos graves de endoftalmite e endocardite (Perfect, 2010). Este é ainda adoptado tendo em conta a redução de resistências e aumento do espectro de actividade sendo nesses casos considerado uma boa opção (Heitman, Joseph; Filler, Scott; Edwards, John; Mitchell, 2006).

Em pacientes adultos a candidose por *C. glabrata* foi associada não só a um aumento da mortalidade como do tempo de internamento, o que significa um aumento nos custos hospitalares (Ruhnke, 2014).

Numa análise recente a micafungina foi considerada como o tratamento com melhor relação custo-eficácia para infecções por *C. glabrata* em comparação com AmB lipídica, principalmente pela menor taxa de nefrotoxicidade e menor custo directo (Ruhnke, 2014).

Pode concluir-se que não ocorre nenhum aumento substancial no custo total para os pacientes tratados com novos AF, uma vez que o tratamento com AF “tradicionais”

aumenta os custos indirectos associados (tratamento de reacções adversas, hospitalização prolongada, mortalidade) (Ruhnke, 2014).

As infecções fúngicas por *C. glabrata* têm continuado a aumentar apesar de já existirem diversas directrizes para otimizar o tratamento destas. A grande preocupação será a evidência dos estudos em que se baseiam para desenvolver o guia de tratamento para candidoses em pacientes adultos não neutropénicos (Póvoa e Gonçalves-Pereira, 2011).

Segundo, Póvoa e Gonçalves-Pereira, 2011, as directrizes com as recomendações para tratamento, revistas em 2009 pela ISDA, devem ser agora reavaliadas nalguns pontos, como o peso e qualidade da evidência.

Estas directrizes representaram uma marcada alteração na terapêutica recomendada, o que segundo, Póvoa e Gonçalves-Pereira, 2011, não tem em conta a eficácia dos diferentes AF. Em todos os estudos em que se basearam, AmB-d e LF-AmB nunca demonstraram inferioridade em relação aos comparadores. Além disso, as equinocandinas não são adequadas ao tratamento de complicações da infecção por *Candida* como endoftalmites, meningites e endocardites, para os quais o fármaco de eleição continua a ser a AmB. Esta alteração é na opinião dos autores devida à possível vantagem das equinocandinas e a disfunção renal associada à AmB, uma vez que, estas directrizes atribuem à terapêutica com AmB um elevado risco de falha renal aguda ou mortalidade.

Perante o exposto, na escolha da terapêutica adequada, devem ser considerados vários aspectos das infecções por *C. glabrata*: epidemiologia local, informação das percentagens de resistência aos AF, estabelecimento e aplicação das directrizes terapêuticas, implementação de estratégias de tratamento por terapêuticas empíricas, de prevenção e estratégias de redução/alteração dos fármacos com o tempo, manutenção e actuação no que diz respeito aos cateteres, assim como procedimentos de rotina para diagnóstico e prevenção de complicações a nível oftalmológico e cardíaco (Ruhnke, 2014).

Pode assim concluir-se que, no caso de não se saber qual a espécie responsável pela infecção, a escolha deve ser condicionada pela situação clínica do paciente e se o mesmo foi exposto anteriormente ao antifúngico fluconazol. Este último deve ficar reservado para doentes não críticos sem exposição recente aos Azóis. O uso de equinocandinas é

recomendado para pacientes hemodinamicamente instáveis ou com exposição anterior ao fluconazol (Garnacho-Montero et al., 2012).

Resistência aos antifúngicos

Segundo, Pfaller, 2012, pode-se definir resistência antifúngica como resistência microbiológica, clínica ou um pouco de ambas. A resistência microbiológica ocorre quando os isolados são inibidos por uma concentração superior à utilizada para as estirpes comuns, sendo que a clínica se traduz numa situação em que o microrganismo infeccioso é inibido por uma concentração de AF associada a uma probabilidade elevada de falha terapêutica.

Esta demonstra ser uma área de estudo essencial uma vez que a resistência aos AF coopera na falha terapêutica e esta contribui, para além de um aumento da morbilidade e mortalidade do doente, para o aumento das resistências (Kiraz et al., 2010).

A resistência de *C. glabrata* aos vários grupos de AF ocorre por processos distintos, uma vez que estes actuam também em diferentes componentes celulares fúngicos. Os locais de actuação e os mecanismos de resistência encontram-se ilustrados na Figura 10.

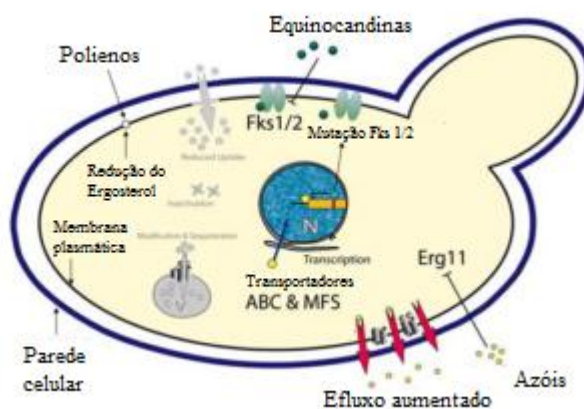


Figura 10: Mecanismos de resistência de *C. glabrata* aos principais grupos de AF. Adaptada de (Tscherner et al., 2011).

A resistência pode ser primária ou secundária (adquirida) e é transversal a algumas espécies de fungos patogénicos, sendo que os mecanismos pelos quais ocorre foram extensivamente estudados (Ruhnke, 2014). O desenvolvimento de resistência secundária pode ser em parte causado pelo facto de *C. glabrata* ser haplóide (Kiraz et al., 2010).

Os Azóis actuam, como já referido, pela inibição do lanosterol α -demetilase sendo este codificado pelo gene *ERG11*, levando a uma redução na biossíntese de ergosterol. Estudos demonstraram que *C. glabrata* tem susceptibilidade intrínseca diminuída a AF, principalmente aos derivados dos Azóis quando comparada com outras espécies. O tratamento prolongado ou profilático com estes contribui igualmente para o desenvolvimento de resistências. Enquanto *C. albicans* baseia o seu mecanismo de resistência na sobre-expressão ou mutação do alvo Erg11, este processo parece estar ausente em *C. glabrata* (Jandric e Schüller, 2011; Tscherner et al., 2011). Esta última parece utilizar o efluxo de fármaco mediado pela sobre-expressão da família de proteínas membranares transportadoras ABC como principal mecanismo molecular de resistência aos Azóis, nomeadamente ao fluconazol (Abbes et al., 2013).

Segundo dados resultantes de um estudo 9.7% das estirpes de *C. glabrata* eram resistentes ao fluconazol, sendo que destas 99% apresentavam resistência cruzada ao voriconazol e 8-9% eram também resistentes à anidulafungina, caspofungina e micafungina (Lewis et al., 2012).

Devido ao aumento de estirpes resistentes ou com resistência variável, o itraconazol deve ser utilizado com precaução no tratamento de candidoses invasivas. Espécies como *C. glabrata* e *C. krusei* são exemplo de espécies resistentes como espelhado na Tabela 13, pensando-se que o principal factor predisponente para o aparecimento de infecções por estas espécies seja a exposição prévia aos Azóis (Gołaś et al., 2014).

Esta resistência aumentada pode dever-se à utilização generalizada de fluconazol, sendo descrita principalmente em pacientes em estado crítico (leucemia, transplantes de medula óssea) (Espinosa e Microbiología, 2010; Gołaś et al., 2014). Globalmente a frequência de resistência ao fluconazol varia entre 3-13%. Não sendo valores muito elevados, é

importante referir a velocidade com que os mesmos têm aumentado e as consequências que têm a nível hospitalar (Espinosa e Microbiología, 2010).

Sabe-se que, a imediata administração de antifúngicos sistémicos com eficácia comprovada reduz significativamente a morbilidade e mortalidade associadas a candidíases invasivas. É no entanto preocupante a menor eficácia de agentes agora considerados de primeira linha no tratamento de candidíases invasivas, particularmente aquelas causadas por *C. glabrata* (Lewis et al., 2012).

Tabela 13: Sensibilidade de *Candida* spp. aos diferentes antifúngicos. Adaptado de (Espinosa e Microbiología, 2010)

| Espécie de <i>Candida</i> | Flucitosina | Anfotericina B | Fluonazol | Itraconazol | Voriconazol | Equinocandinas |
|---------------------------|-------------|----------------|-----------|-------------|-------------|----------------|
| <i>C. albicans</i> | S | S | S | S | S | S |
| <i>C. tropicalis</i> | S | S | S | S | S | S |
| <i>C. parapsilosis</i> | S | S | S | S | S | S-I |
| <i>C. Glabrata</i> | S | S-I | S-DD a R | S-DD a R | S-I | S |
| <i>C. krusei</i> | I-R | S-I | R | S-DD a R | S-I | S |
| <i>C. lusitaniae</i> | S | S a R | S | S | S | S |
| <i>C. guilliermondi</i> | S | S | S | S | S | S |

S: sensível; S-DD: sensibilidade dose-dependente; I: intermédia; R: resistente

Para o tratamento de infecções por *C. parapsilosis* e *C. glabrata* são necessárias concentrações de micafungina e voriconazol muitas vezes 2.5 a 5 vezes superiores à concentração mínima inibitória (CMI) extracelular (Lewis et al., 2012).

Uma das características mais desejadas num AF é apresentar capacidade fungicida o que permite uma remoção mais rápida do fungo do organismo. De entre os AF utilizados na prática clínica as equinocandinas e a AmB possuem esta característica (Sampaio e Pais, 2014).

A resistência ao grupo dos polienos do qual a AmB é a mais proeminente, foi verificada em isolados clínicos de diferentes espécies de *Candida* spp., incluindo *C. glabrata*, sendo que a

redução na quantidade ergosterol presente na membrana plasmática parece ser a causa desta susceptibilidade diminuída (Tschermer et al., 2011).

A classe das equinocandinas é a mais prescrita para pacientes com diagnóstico de IFI. Como referido no capítulo anterior, estas actuam na síntese do 1,3- β -D-glicano, inibindo as Fks1/Fsk2 sintetases (o gene *FKS3* parece também estar alterado em *C. glabrata*), responsáveis pela produção deste componente essencial da parede celular. Como esperado, mutações nestas sintetases são responsáveis pela susceptibilidade reduzida de *C. glabrata* a este grupo de AF. Estas alterações originam uma resistência transversal a toda a classe. Células de *Candida* expostas a concentrações próximas da CMI sofrem alterações na parede celular o que as deixa susceptíveis à lise osmótica (Lewis et al., 2012; Pfaller, 2012). Dados globais demonstram que a resistência de *C. glabrata* às equinocandinas varia entre 1 a 3% e é maior entre os isolados recolhidos na América do Norte (Sampaio e Pais, 2014).

Dados referentes aos efeitos das mutações em *FKSI* de *C. glabrata* mostram que as estirpes mutadas para resistência às equinocandinas produzem biofilme com uma matriz menos densa mas com massa similar (Lewis et al., 2012).

O tratamento de *C. albicans* com inibidores de histonas decitilases (HDAC) tem também aumentado fortemente a sensibilidade de fungos patogénicos às diferentes classes de AF. Pensa-se que enzimas modificadoras de histonas estejam de algum modo envolvidas na regulação da resistência a fármacos em *C. glabrata* e deve ser considerada segundo os autores, Tschermer et al., 2011, como um alvo potencial para futuros fármacos.

Tendo em conta todos os dados, é importante ressaltar que um fenótipo resistente a vários fármacos é normalmente causado pela activação consecutiva de um distinto número de mecanismos activos em diferentes tipos de células desde bacterianas a cancerígenas (Tschermer et al., 2011).

Enquanto outros mecanismos de resistência podem ser apresentados por grande parte dos microrganismos, o efluxo de fármacos mediado por transportadores representa o principal mecanismo utilizado por *C. glabrata* (Tschermer et al., 2011).

Os testes de susceptibilidade a AF encontram-se estandardizados a nível internacional e tornaram-se essenciais no acompanhamento dos pacientes e na vigilância de resistências. A melhoria nos testes disponíveis para avaliação das resistências em conjunto com a caracterização dos mecanismos de resistência, permitem a optimização da eficácia da terapêutica antifúngica (Pfaller, 2012). Devido à reduzida susceptibilidade de *C. glabrata* a algumas classes de AF a avaliação de susceptibilidade torna-se essencial. Para avaliação da mesma foi necessário o desenvolvimento de testes reprodutíveis e clinicamente relevantes. O método de microdiluição serve para avaliar a susceptibilidade aos AF e também para a determinação de CMI's *in vitro*, é no entanto dispendioso e complexo. Actualmente existem dois conjuntos de regras para o método de microdiluição os do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e os do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Ambos utilizam a microdiluição embora haja diferenças no valor de CMI e no tamanho do inóculo. O CLSI desenvolveu outro método mais conveniente, simples e económico o teste de difusão em disco, particularmente adequado a AF solúveis em água como o fluconazol e voriconazol. Pode também ser utilizado para determinar a susceptibilidade *in vitro* de leveduras às equinocandinas (Kiraz et al., 2010; Pfaller, 2012).

Resultados falsos positivos devem ser uma preocupação na utilização do teste de difusão em disco, especialmente em *C. glabrata* e outras espécies não *albicans*. Por isso, apesar de este ser um teste mais acessível a nível técnico, quando se trata de *C. glabrata* deve ser utilizado com precaução (Kiraz et al., 2010).

A emergência de resistências múltiplas em *C. glabrata* deve ser uma preocupação devido ao facto de nem os Azóis nem a AmB se apresentarem como terapia ideal para infecções por *C. glabrata* (Pfaller, 2012). Estratégias de tratamento que melhorem a actividade intracelular dos AF ou a resposta imunitária do hospedeiro podem ser a chave para diminuir a resistência antifúngica e tratar infecções persistentes por *C. glabrata* (Lewis et al., 2012).

Além das resistências a cada uma das classes de AF é preocupante, após exposição prolongada a agentes AF, o desenvolvimento de estirpes de *C. glabrata* MDR. MDR traduz-se na resistência a duas ou mais classes de AF representando uma dificuldade durante o tratamento de IFI pela presença de mutações FKS (Sampaio e Pais, 2014).

Perspectivas futuras

Um melhor controlo das infecções por *C. glabrata* é essencial num futuro próximo, para isso a adopção do conceito de *stewardship* é indispensável. Este caracteriza-se pelo esforço contínuo por parte de uma unidade hospitalar em otimizar o uso de antimicrobianos de modo a garantir bons resultados para os pacientes, tendo em conta o custo-efectividade e reduzindo as sequelas advindas dos efeitos secundários. Neste conceito insere-se a utilização responsável de ATB e AF através da selecção do fármaco adequado à situação, na dosagem, duração e via de administração adequadas, que no âmbito deste trabalho ganha uma enorme relevância (Ruhnke, 2014).

Deve também avaliar-se cautelosamente a instituição de terapêutica empírica. Estudos prospectivos randomizados demonstraram que o tratamento empírico precoce em pacientes neutropénicos com factores de risco e que apresentam febre inexplicável durante 5-6 dias, apesar de serem administrados antibióticos de amplo espectro, reduz a frequência de desenvolvimento de fungémia e a morbilidade e mortalidade a esta associada (Espinosa e Microbiología, 2010).

Continua sem existir um consenso geral sobre a profilaxia em doentes não neutropénicos internados nas UCIs, sendo que as mais recentes directrizes da ISDA recomendam a administração de fluconazol em doses de 400 mg/dia em UCIs com altas taxas de candidose. Esta prática não parece contudo estar associada ao desenvolvimento de resistências ao fluconazol ou provocar uma alteração nas espécies de *Candida* responsáveis por infecções nessa UCI (Espinosa e Microbiología, 2010). No futuro a instituição deste tipo de terapêutica deve ser ponderada de modo a revelar-se benéfica.

Em casos específicos, por exemplo quando se está perante um caso de infecção fúngica após cirurgia para implante de uma prótese, é normal a retirada da mesma, cateter ou o que se pense ser fonte de contaminação. Felizmente houve algum avanço nesta área e existe, nos dias de hoje, reportado um caso de sucesso no tratamento de uma infecção por *C. glabrata* em que a prótese foi preservada. Como referido por, Zhu, Yue, Huang, e Pei, 2014, “o paciente foi tratado com sucesso com formulação IV e oral de voriconazol sem a remoção da prótese da anca”. A infecção por *C. glabrata* após este tipo de cirurgia é muito

rara e é normalmente assintomática no início do processo infeccioso o que leva à sua detecção tardia. Este caso demonstra a importância da rápida identificação do patógeno, que permite o controlo da infecção, diminuindo os efeitos no doente, e reduzindo os custos associados (Zhu et al., 2014).

A espécie pela qual o paciente é infectado também influencia a duração da permanência hospitalar, sendo que infecções por *C. glabrata* estão associadas a internamentos mais longos e com custos mais elevados quando comparada com *C. albicans*, em pacientes com sinais de infecção em estado inicial (Moran, Grussemeyer, Spalding, Benjamin, e Reed, 2010). Reconhecer uma infecção fúngica na sua fase inicial e identificar a espécie responsável pela mesma influenciam o percurso de tratamento do doente. A falha nestes passos cruciais leva a hospitalizações mais prolongadas, maiores custos e elevada mortalidade. Para que num futuro próximo isto não se verifique será necessário reconhecer a importância do diagnóstico expedito deste tipo de infecções.

Segundo, Ruhnke, 2014, para melhorar a eficácia da terapêutica, as linhas venosas centrais devem ser tidas em conta como possível foco de infecção e devem ser removidas assim que possível, independentemente de serem foco primário da infecção ou uma colonização secundária (Ruhnke, 2014). A remoção deve ser efectuada em conjunto com o início de terapêutica antifúngica. Se estes forem mantidos, a duração da infecção por *C. glabrata* aumenta, assim como a mortalidade associada. A melhor altura para proceder à remoção gera ainda controvérsia, mas é ao dia de hoje aceite que deve ser efectuada o mais rapidamente possível.

A emergência de estirpes de *C. glabrata* MDR, como referido anteriormente, dificulta a implementação de tratamento antifúngico e deve ser tema de análise prioritário. O facto de nem o grupo dos Azóis nem a AmB se apresentarem como terapêutica óptima para o tratamento destas infecções representa um problema. A vigilância futura deve ser efectuada com vista à identificação do desenvolvimento de novas estirpes MDR e cada instituição de saúde deve controlar e repensar o uso de cada classe de AF e a frequência de infecções por *C. glabrata* nos seus serviços (Pfaller, 2012).

Conclusão

Após a realização deste trabalho posso concluir que *C. glabrata* é um patógeno em ascensão, assim como todas as espécies não *albicans*.

Existe um ponto em que todos os especialistas sobre esta matéria parecem concordar, o uso indiscriminado de fluconazol aumentou o número de infecções por espécies de *Candida* spp. com menor poder patogénico, designadamente *C. glabrata*, e aumentou em larga escala as resistências desenvolvidas. É agora mais difícil tratar infecções fúngicas, o que, associado ao seu aumento generalizado e ao maior número de pessoas susceptíveis às mesmas representa um problema a necessitar de resolução rápida.

O uso intensivo de antifúngicos em ambiente hospitalar desencadeou um aumento das infecções fúngicas que ocorrem nos pacientes internados. Sabe-se que, especificamente no caso de *C. glabrata*, a exposição prévia aos Azóis é determinante para a proliferação desta espécie. Com o avanço da medicina as técnicas utilizadas para prolongar o tempo de vida dos doentes são cada vez mais extremas, e com isso, os microrganismos que anteriormente eram apenas comensais passaram a possuir capacidade de infectar o Homem, tornando-se patogénicos.

Novos estudos apontam a idade dos pacientes, além da exposição aos Azóis, como factor contribuinte para o desenvolvimento de infecções por *C. glabrata*. Tendo em conta os avanços alcançados na área da saúde seria previsível que a esperança média de vida aumentasse, o que ocorreu nos últimos anos, e ao que parece a maior prevalência de infecções por *C. glabrata* é consequência disso.

O avanço na medicina nos últimos anos permitiu não só o tratamento de doenças graves, como a oncológica e a infecção VIH/SIDA, como permitiu aumentar a esperança média de vida destes doentes. O aumento do número de indivíduos imunodeprimidos, entre eles doentes com VIH/SIDA, contribuiu bastante para a enorme propagação de infecções por *Candida* spp.. Enquanto estes doentes são principalmente afectados por infecções fúngicas ao nível das mucosas, os pacientes com neutropénia apresentam maior predisposição para infecções fúngicas

invasivas. Se o tipo de imunodepressão influencia a gravidade da infecção por *Candida*, então deve ser tido em conta aquando da escolha do AF.

Novos dados sobre diagnóstico, tratamento e mecanismos pelos quais *C. glabrata* exerce a sua patogenicidade devem ser considerados tanto no desenvolvimento de directrizes internacionais como para o desenvolvimento de normas internas ou adaptação das directrizes. Apesar de já existir alguma padronização na área do diagnóstico, não é suficiente, sendo necessárias mais análises custo-benefício além de estudos que investiguem a aplicabilidade de um estudo à prática clínica diária.

Os critérios de administração de AF nas UCIs estão também longe de níveis aceitáveis. No caso de doentes em estado crítico é ainda de maior relevância estarem disponíveis para os profissionais de saúde normas que permitam salvaguardar o paciente da exposição a AF que se revelam *A posteriori* desnecessários. Além de esta situação representar incomodo para o doente em causa, levanta outras questões como o desenvolvimento de resistências.

É importante que os novos dados sejam avaliados e tidos em conta aquando da revisão das directrizes para o tratamento de infecções fúngicas invasivas. Segundo diversos estudos o tratamento profilático deve ser evitado e o tratamento empírico melhor controlado.

Apesar de alertados há décadas para o problema das resistências aos ATB, só hoje em dia se vêem mudanças significativas no modo de actuação dos profissionais de saúde, o que indica, a meu ver, que uma longa jornada que se encontra pela frente para a mesma mudança ser adoptada para os AF. Apesar de parecer um problema menor em comparação com os ATB, as informações de que dispomos mostram exactamente o contrário. O leque de AF conhecidos é muito menor que o de ATB e a enorme velocidade a que as resistências se têm vindo a desenvolver representa outro problema.

Pode concluir-se que elaborar um diagnóstico preciso no momento em que o doente pode beneficiar dele, representa actualmente uma dificuldade. Por este motivo é necessária uma abordagem interdisciplinar na qual a apresentação clínica, os resultados laboratoriais e a observação microscópica desempenhem papéis fulcrais.

Para isso a adoção de procedimentos internos ou externos (directrizes) deve ser uma prioridade, uma vez que, além de permitir futuras comparações de dados, permite uma actuação imediata com base nessas regras.

Escolher entre métodos de diagnóstico pode revelar-se um verdadeiro desafio. Além de ter em conta o tempo precioso que se despende com este processo, a eficácia e a reprodutibilidade, há que ter em conta que todos beneficiam de uma padronização dos processos utilizados no diagnóstico de micoses invasivas e é para este fim que todos devemos trabalhar.

Se os profissionais de saúde não forem consciencializados para o impacto que as infecções fúngicas têm na morbilidade e mortalidade e no funcionamento hospitalar (prolongamento dos internamentos, custos acrescidos) a implementação das directrizes desenvolvidas irá continuar a ocorrer de forma lenta e pouco eficaz.

Bibliografia

- A. Lees. (n.d.). *Empirical / pre-emptive antifungal therapy in adult neutropenic patients*. Disponível em [http://www.gloshospitals.nhs.uk/SharePoint110/Antibiotics Documents/neutropenic_sepsis_antifungals.pdf](http://www.gloshospitals.nhs.uk/SharePoint110/Antibiotics/Documents/neutropenic_sepsis_antifungals.pdf)
- Abbes, S., Mary, C., Sellami, H., Michel-Nguyen, A., Ayadi, A., e Ranque, S. (2013). Interactions between copy number and expression level of genes involved in fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3(November), 74. doi:10.3389/fcimb.2013.00074
- Ahmad, S., Khan, Z., Mustafa, A. S., e Khan, Z. U. (2002). Seminested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2483–2489. doi:10.1128/JCM.40.7.2483-2489.2002
- Badali, H., e Nabili, M. (2012). Molecular Tools in Medical Mycology; Where We Are! *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(1), 1–3. doi:10.5812/jjm.8566
- Brunke, S., e Hube, B. (2013). Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cellular Microbiology*, 15(5), 701–8. doi:10.1111/cmi.12091
- Canton, E., García-rodríguez, J., Martín-mazuelos, E., e Pemán, J. (2014). Métodos microbiológicos para el diagnóstico , manejo y estudio de la infección fúngica invasora, 32(6), 375–379.
- Cassone, A., e Cauda, R. (2012). *Candida* and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders. *AIDS (London, England)*, 26(12), 1457–72. doi:10.1097/QAD.0b013e3283536ba8
- Choi, Y., Wang, H.-Y., Lee, G., Park, S.-D., Jeon, B.-Y., Uh, Y., ... Lee, H. (2013). PCR-reverse blot hybridization assay for screening and identification of pathogens in sepsis. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(5), 1451–7. doi:10.1128/JCM.01665-12
- Clancy, C. J., e Nguyen, M. H. (2013). Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(9), 1284–92. doi:10.1093/cid/cit006
- Cornely, O. a, Bassetti, M., Calandra, T., Garbino, J., Kullberg, B. J., Lortholary, O., ... Ullmann, a J. (2012). ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18 Suppl 7, 19–37. doi:10.1111/1469-0691.12039

- Cornistein, W., Mora, A., Orellana, N., e Javier, F. (2014). Candida : epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans, *31*(6), 380–384.
- Espinosa, C., e Microbiología, S. M. (2010). Candidemias nosocomiales : nuevos retos de un problema emergente.
- Garcia-Vidal, C., e Carratalà, J. (2012). [Pathogenesis of invasive fungal infections]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *30*(3), 151–8. doi:10.1016/j.eimc.2011.09.011
- Garnacho-Montero, J., Díaz-Martín, A., Ruiz-Pérez De Piappón, M., e García-Cabrera, E. (2012). [Invasive fungal infection in critically ill patients]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *30*(6), 338–43. doi:10.1016/j.eimc.2012.02.011
- Gioio, M. P., Inez, T., e Svidzinski, E. (2010). Fisiopatogenia , epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia, 225–234.
- Golaś, M., Netsvyetayeva, I., Sikora, M., e Piskorska, K. (2014). Trends in Antifungal Susceptibility of Candida Species – one Year Observation, *63*(2), 217–222.
- Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of Candida species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *20 Suppl 6*, 5–10. doi:10.1111/1469-0691.12539
- Heitman, Joseph; Filler, Scott; Edwards, John; Mitchell, A. (2006). *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis*. (J. Heitman, Ed.) (ilustrada., p. 684). Washington DC: ASM Press, 2006.
- Jandric, Z., e Schüller, C. (2011). Stress response in Candida glabrata: pieces of a fragmented picture. *Future Microbiology*, *6*, 1475–1484. Disponible from <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.11.131>
- Javier Pemán, R. Z. (2010). Current diagnostic approaches to invasive candidiasis in critical care settings. *Mycoses*, *53*(5), 424–433.
- Jr, P. L. F., Vazquez, J. A., Sobel, J. D., e Fidel, P. L. (1999). Candida glabrata : Review of Epidemiology , Pathogenesis , and Clinical Disease with Comparison to C . albicans. *Candida glabrata : Review of Epidemiology , Pathogenesis , and Clinical Disease with Comparison to C . albicans*, *12*(1).
- Karageorgopoulos, D. E., Vouloumanou, E. K., Ntziora, F., Michalopoulos, A., Rafailidis, P. I., e Falagas, M. E. (2011). β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *52*(6), 750–70. doi:10.1093/cid/ciq206

- Khan, Z., e Ahmad, S. (2012). Invasive candidiasis: A review of nonculture-based laboratory diagnostic methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. doi:10.4103/0255-0857.99482
- Kiraz, N., Dag, I., Oz, Y., Yamac, M., Kiremitci, a, e Kasifoglu, N. (2010). Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*. *Journal of Microbiological Methods*, 82(2), 136–40. doi:10.1016/j.mimet.2010.05.002
- Lass-Flörl, C., Mutschlechner, W., Aigner, M., Grif, K., Marth, C., Girschikofsky, M., ... Nachbaur, D. (2013). Utility of PCR in diagnosis of invasive fungal infections: real-life data from a multicenter study. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(3), 863–8. doi:10.1128/JCM.02965-12
- Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoeft A, et al. (2008). A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Medical Microbiology Immunology*, 197(3), 13–24.
- León, C., Ostrosky-Zeichner, L., e Schuster, M. (2014). What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Medicine*, 40(6), 808–19. doi:10.1007/s00134-014-3281-0
- Lewis, R. E., Viale, P., e Kontoyiannis, D. P. (2012). The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida*, 3(4), 368–376.
- Low, C.-Y., e Rotstein, C. (2011). Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Medicine Reports*, 3(July), 14. doi:10.3410/M3-14
- Merck. (2014). *FDA Approves Merck's NOXAFIL® (posaconazole) Injection (18 mg/mL) for Intravenous Use*. Disponível September 23, 1BC, from <http://www.mercknewsroom.com/news-release/prescription-medicine-news/fda-approves-mercks-noxafil-posaconazole-injection-18-mgml-i>
- Minami, P. S. (2003). *Métodos Laboratoriais de diagnóstico das Micoses* (pp. 19–22). Barveri, SP.: Editora Manole.
- Miyazaki, T., e Kohno, S. (2014). ER stress response mechanisms in the pathogenic yeast *Candida glabrata* and their roles in virulence. *Virulence*, 5(2), 365–70. doi:10.4161/viru.27373
- Moran, C., Grussemeyer, C. a, Spalding, J. R., Benjamin, D. K., e Reed, S. D. (2010). Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. *American Journal of Infection Control*, 38(1), 78–80. doi:10.1016/j.ajic.2009.06.014

- Moreira, S., Pereira, A. L., e García-zapata, M. T. A. (2011). Manifestações bucais na infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana: uma revisão sistemática da literatura . Oral manifestations in HIV infection: a systematic literature review . Método, 57–65.
- Ochiabuto, O. M. T. B., Nwankwo, A., Enweani, I. B., e Okoye, J. O. (2014). Fungal Isolation in HIV Patients and CD4 Count, 2(2), 111–122.
- Oren, I., e Paul, M. (2014). Up to date epidemiology , diagnosis and management of invasive fungal infections.
- Ostrosky-Zeichner, L. (2012). Invasive mycoses: Diagnostic challenges. *American Journal of Medicine*, 125. doi:10.1016/j.amjmed.2011.10.008
- Ostrosky-Zeichner, L., e Pappas, P. G. (2006). Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Critical Care Medicine*, 34, 857–863. doi:10.1097/01.CCM.0000201897.78123.44
- Pappas, P. G., Kauffman, C. a, Andes, D., Benjamin, D. K., Calandra, T. F., Edwards, J. E., ... Sobel, J. D. (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48(5), 503–35. doi:10.1086/596757
- Párola, A. G. (2011). *Estudo Epidemiológico de Candidíase Invasiva na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Egas Moniz - Centro Hospitalar Lisboa Ocidental*. Universidade de Lisboa Faculdade de Medicina de Lisboa.
- Pemán, J. (2014). Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras &, 31(5), 328–341.
- Perfect, J. R. (2010). NIH Public Access, 4(2), 87–95. doi:10.1007/s12281-010-0018-6.Use
- Pfaller, M. a. (2012). Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*, 125(1 Suppl), S3–13. doi:10.1016/j.amjmed.2011.11.001
- PNA Peptide Nucleic Acid*. (n.d.). Disponível September 24, 1BC, from <http://www.highveld.com/molecular-biology/pna.html>
- Póvoa, P., e Gonçalves-Pereira, J. (2011). Treatment of candidemia in adult patients without neutropenia--an inconvenient truth. *Critical Care (London, England)*, 15(1), 114. doi:10.1186/cc9414

- Quindós, G., Eraso, E., López-Soria, L. M., e Ezpeleta, G. (2012). [Invasive fungal disease: conventional or molecular mycological diagnosis?]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(9), 560–71. doi:10.1016/j.eimc.2011.10.018
- Riera, M., Mogensen, E., d'Enfert, C., e Janbon, G. (2012). New regulators of biofilm development in *Candida glabrata*. *Research in Microbiology*, 163(4), 297–307. doi:10.1016/j.resmic.2012.02.005
- Ruhnke, M. (2014). Antifungal stewardship in invasive *Candida* infections. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20 Suppl 6, 11–8. doi:10.1111/1469-0691.12622
- Sampaio, P., e Pais, C. (2014). Epidemiology of Invasive Candidiasis and Challenges for the Mycology Laboratory: Specificities of *Candida glabrata*. *Current Clinical Microbiology Reports*, 1(1-2), 1–9. doi:10.1007/s40588-014-0002-y
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., e Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 288–305. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x
- Tscherner, M., Schwarzmüller, T., e Kuchler, K. (2011). Pathogenesis and Antifungal Drug Resistance of the Human Fungal Pathogen *Candida glabrata*. *Pharmaceuticals*, 4(12), 169–186. doi:10.3390/ph4010169
- Ullmann, a J., Cornely, O. a, Donnelly, J. P., Akova, M., Arendrup, M. C., Arikan-Akdagli, S., ... Cuenca-Estrella, M. (2012). ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: developing European guidelines in clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18 Suppl 7, 1–8. doi:10.1111/1469-0691.12037
- Vallejo, J. C., e Ruiz-camps, I. (2014). Infección fúngica invasora en los pacientes hematológicos &, 30(9), 572–579.
- Walsh, T. J., e Gamaletsou, M. N. (2013). Treatment of fungal disease in the setting of neutropenia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2013, 423–7. doi:10.1182/asheducation-2013.1.423
- Zhu, Y., Yue, C., Huang, Z., e Pei, F. (2014). *Candida glabrata* infection following total hip arthroplasty: A case report. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(2), 352–354. doi:10.3892/etm.2013.1420

Zilli, D. M. W. (2006). *Catabolismo da trealose extracelular e caracterização bioquímica da trealose ácida de Candida glabrata*. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.